

Validierung eines humanisierten Tiermodelles für Colitis ulcerosa

von Kilian Schwaab

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Validierung eines humanisierten Tiermodelles für Colitis ulcerosa

von Kilian Schwaab
aus Schweinfurt

München, 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am Klinikum der Universität München: Klinik für Allgemeine, Viszeral-,
Transplantations-, Gefäß- und Thoraxchirurgie

Mentoren: Herr Prof. Dr. Matthias Siebeck und Frau Dr. Roswitha Gropp

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Prof. Dr. Clemens Knospe

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis	8
Einleitung	10
Literaturübersicht	11
Colitis ulcerosa	11
Definition	11
Epidemiologie	11
Äthiologie	11
Pathogenese	11
Klinische Symptome	12
Verlauf der Colitis ulcerosa	13
Diagnose und Therapie	13
Chirurgische Intervention	17
Immunologie der Colitis ulcerosa	18
Funktionen von T-Zell sezernierten Zytokinen in der Mucosa von CED	22
Tiermodelle in der Forschung	22
Tiermodelle der Colitis ulcerosa	23
Oxazolon-induzierte Kolitis bei der Maus	23
Oxazolon induzierte Colitis bei NOD-scid IL2R γ -chain ^{null} Mäusen	25
Entwicklung	25
Eigenschaften der NOD-scid IL2R γ -chain ^{null} Mäuse	26
Beschriebene Vorgänge in der Oxazolon induzierten Colitis in Mäusen mit humanisiertem Immunsystem	26
Ethanol induzierte Kolitis in den NOD-scid IL2R γ -chain ^{null} Mäusen mit humanisiertem Immunsystem	28
Die Ziele und Hypothesen der Dissertation	29
Material und Methoden	32
Rekrutierung der Spender	32
Haltung der Mäuse	32
Isolierung hPBMCs und Rekonstitution der Mäuse	32
Rekonstitution der Mäuse	33

Behandlungsschema zur Kolitis Induktion.....	33
Klinischer Aktivitätsscore	35
Probenanalyse des Tierversuches	37
Histologie	37
Beschichten von Objektträgern	38
Anfertigen der Gewebeschnitte	38
HE Färbung	38
Bestimmung des humanen IgE und IgG-Gehaltes im Serum.....	39
Durchflusszytometrie (FACS/fluorescence-activated cell sorting):.....	39
Durchflusszytometrie-Parameter und Gating Strategie:.....	41
Statistische Auswertung	41
Ergebnisse	42
Ergebnisse der Spenderauswertung.....	42
Durchflusszytometrische Analyse des humanen peripheren Blutes	42
Ergebnisse des Tierversuchs	44
Der Einfluss des immunologischen Hintergrunds der Spender und der Behandlung auf den Rekonstitutionsgrad.....	44
Der Einfluss des immunologischen Hintergrunds der Spender und der Behandlung auf den klinischen Aktivitätsscore	45
Der Einfluss des immunologischen Hintergrundes des Spenders und der Behandlung auf die Sekretion von humanen Immunglobulinen IgE und IgG.....	46
Einfluss der Behandlung und des Spenderhintergrundes auf B-Zellen und aktivierte B-Zellen...	47
Einfluss der Behandlung und des Spenderhintergrundes auf T-Zellen und Subtypen der T-Zellen	49
Einfluss der Behandlung und des Spenderhintergrundes auf die Kolonlänge	51
Einfluss der Behandlung und des Spenderhintergrundes auf die Histologie	53
Durchflusszytometrische Analyse des Kolons	54
Testung eines Th2 Inhibitors	56
Einfluss des Th2-Inhibitors auf den Rekonstitutionsgrad	56
Einfluss des Th2-Inhibitors auf den klinischen Aktivitätsscore	57
Einfluss des Th2-Inhibitors auf T-Zellen	58

Einfluss des Th2-Inhibitors auf B-Zellen und IgE und IgG-Werte	61
Einfluss des Th2-Inhibitors auf die Kolonlänge.....	63
Durchflusszytometrische Analyse des Kolons	63
Einfluss des Th2-Inhibitors auf das histologische Bild des Kolons	64
Diskussion	66
Bewertung des Tiermodells.....	71
Stärken und Limitationen der Arbeit.....	72
Ausblick	73
Zusammenfassung	74
Summary	76
Literatur	77
Anhang	81
Abbildungsverzeichnis	87
Tabellenverzeichnis.....	89
Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
APC	Antigen präsentierende Zelle
B-Zelle	Aus dem Knochenmark stammender Lymphozyt
CD	Cluster of Differentiation, Oberflächenmerkmal der Zellen
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CRTH2	Oberflächenmolekül der T Helferzellen Typ 2
CY	Cyanin Farbstoff
DC	Dendritische Zelle
DSS	Dextran-natriumsulfat
FACS	Fluorescence associated cell sorting, Durchflusszytometrische Analyse
FITC	Fluorescein isothiocyanate Farbstoff
hCD	Oberflächenmerkmal von Zellen humanen Ursprungs
hCRTH2	Oberflächenmerkmal von T Helferzellen Typ 2 humanen Ursprungs
hDC	Dendritische Zellen humanen Ursprungs
hIgE	Immunglobulin E humanen Ursprungs
hIgG	Immunglobulin G humanen Ursprungs
hMakrophagen	Makrophagen humanen Ursprungs
hNK	Natürliche Killerzellen humanen Ursprungs
IFN- γ	Interferon gamma
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

IL-23R	Interleukin 23 Rezeptor
ILC	innate lymphoid cell, angeborene lymphoide Zelle
LGL	large granular lymphocytes, große granuläre Lymphozyten
MMP	Matrix Metalloprotease
NF	nuclear factor
NK	Natürliche Killerzelle
NK-T	Natürliche Killer T-Zelle
NOD-like Rezeptor	Nucleotide-binding oligomerization domain receptor
NOD-scid	Non obese diabetic severe combined immunodeficiency
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PE	Phycoerythrin Farbstoff
PECY7	Phycoerythrin Cyanin 7 Farbstoff
PRR	Pathogen-recognition Receptor,
<i>p</i> -Wert	Signifikanzwert
Stat	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBX21	Th1 Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor
Th0	T Helferzelle Typ 0
Th1	T Helferzelle Typ 1
Th2	T Helferzelle Typ 2
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor-nekrose Faktor alpha
T-Zelle	Aus dem Thymus stammender Lymphozyt
γ -GT/AP	gamma-Glutamyl-Transferase/Alkalische Phosphatase

Einleitung

Die Colitis ulcerosa ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Dickdarms, deren Pathogenese bis heute nicht völlig geklärt ist [1]. Colitis ulcerosa tritt oft zwischen dem 16. und 25. Lebensjahr auf [2] und geht für Betroffene mit großen sozialen und gesundheitlichen Einschränkungen einher. Deswegen ist es von großem Interesse für Betroffene und Angehörige, die Colitis ulcerosa besser zu erforschen und neue Therapieansätze zu entwickeln. Dazu gehört auch die Entwicklung von Tiermodellen, die die menschliche Krankheit besser widerspiegeln. Das Ziel dieser Arbeit war, das in dieser Gruppe bereits etablierte Tiermodell zu optimieren und zu validieren. Zudem sollte geprüft werden, ob dieses Tiermodell zur Testung von spezifischen Inhibitoren geeignet ist.

Literaturübersicht

Colitis ulcerosa

Definition

Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine chronisch, entzündliche Dickdarmerkrankung mit kontinuierlicher Ausbreitung und Ulzerationen der oberflächlichen Schichten der Dickdarmschleimhaut mit Blutungen [1].

Epidemiologie

Colitis ulcerosa hat in Deutschland eine Inzidenz von 3-3,9 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Der Häufigkeitsgipfel findet zwischen dem 16. und 25. Lebensjahr statt [2]. Eine familiäre Häufung findet bei Geschwistern mit einer Häufigkeit von 10-15-fach erhöhter Inzidenzrate im Vergleich zur Restbevölkerung statt [1, 2].

Äthiologie

Zurzeit gibt es keine gesicherten Erkenntnisse über auslösende Faktoren, jedoch werden genetische Faktoren sowie Umweltfaktoren diskutiert [1, 3].

Pathogenese

Die Pathogenese ist nicht geklärt, wobei eine möglicherweise gestörte Darmbarriere und Darmflora gegenüber der physiologischen Darmflora vermutet werden [1]. Weiterhin, gibt es Colitis ulcerosa-Patienten, die von zurückliegenden Darminfektionen berichten [1].

Im Verlauf der Colitis ulcerosa werden 3 pathogenetische Phasen beschrieben:

Bei der ersten handelt es sich um eine Barrierestörung der Darmschleimhaut, einhergehend mit dem systemischen Eindringen von Bakterien [1]. Weiter folgt die zweite pathogenetische Phase, die durch eine starke Abwehrreaktion gekennzeichnet ist. Diese Reaktion wird von T-Zellen, Makrophagen und anderen Entzündungsmediatoren charakterisiert [1]. Diese leitet die dritte Phase der Ausbildung lokaler Gewebeschädigungen ein, die durch Erosionen, Ulzerationen und Nekrosen charakterisiert ist [1]. Es werden drei Lokalisationen beschrieben, die nach der Montreal-Klassifikation eingeteilt werden [1]. Die Ausbreitung erfolgt vom distalen Rektum aus, wobei die Ausbreitungsrichtung nach proximal erfolgt [1].

Das ausschließliche Krankheitsgeschehen im Rektosigmoid wird bei 50 % der Erkrankungen beschrieben. Eine zusätzliche linksseitige Kolitis findet sich bei 25 % und eine Pankolitis bei weiteren 25 % [1].

Die „Linksseitenkolitis“ beschreibt einen Befall vom Rektum bis zur linken Flexur und die Pankolitis einen Befall des gesamten Kolons [1].

Die Montreal-Klassifikation unterscheidet in: E1 Proktitis, E2 Linksseitenkolitis und E3 Pankolitis [1, 2].

Ein frühes sowie ein chronisch, fortgeschrittenes Stadium lassen sich makroskopisch unterscheiden [1]. Das frühe Stadium wird durch flächige, gerötete, sowie geschwollene Schleimhäute mit Kontaktblutung charakterisiert. Eine normale Gefäßzeichnung ist nicht erkennbar und es finden sich punktförmige Schleimhautulzera mit weißlichen Fibrinbelägen [1]. In der histologischen Analyse finden sich typische sogenannte „Kryptabszesse“, die als Granulozyteninfiltrationen der Schleimhaut mit Eiter in den Krypten beschrieben sind [1, 2, 4]. Im chronisch-fortgeschrittenen Stadium liegen eine makroskopische Schleimhautzerstörung mit Verlust des normalen Faltenreliefs, sowie der Verlust der Haustrierung vor. Die restlichen Schleimhautinseln finden sich als Pseudopolypen wieder [1]. Histologisch wird dieses Stadium durch eine überwiegend mit Lymphozyten und Histiozyten infiltrierte Schleimhaut gekennzeichnet. Auch Schleimhautatrophie sowie DALM (dysplasia associated lesion or mass) sind in diesem Stadium zu finden. Mögliche Epitheldysplasien sind Vorläufer karzinomatöser Entartungen und können in „low-grade“ und „high-grade“-Dysplasie unterschieden werden [1].

Klinische Symptome

Als Leitsymptom der Colitis ulcerosa finden sich blutig-schleimige Durchfälle, die mit Fieber und Anämie einhergehen. Zudem wird ein krampfartiger Abdominalschmerz beschrieben, der im linken Unterbauch vor der Defäkation auftritt (Tenesmen) [1, 4].

Weitere mögliche Komplikationen finden sich in hoher Anzahl wieder. Einige davon sind extraintestinale Symptome der Haut, Augen und Gelenke, sowie in der Leber. Diese extraintestinalen Symptome treten allerdings bei Morbus Crohn häufiger auf. Auch Wachstumsstörungen im Kindesalter finden sich bei Colitis ulcerosa Patienten [1, 2, 4].

Gewichtsverlust und massive Blutungen sind Ergebnisse der Colitis ulcerosa und können das Leben der Patienten massiv einschränken. Eine der größten Komplikationen ist die Kolondilatation, die mit Sepsis, Peritonitis und Perforationsgefahr einhergehen kann. Als kritische Kolondilatation gilt ein Kolon, das größer als 6 cm im Röntgen des Abdomens dargestellt wird [1].

Das Risiko eines kolorektalen Karzinoms korreliert mit dem Ausmaß der Kolonbeteiligung, sowie der Dauer der Erkrankung [1, 5]. Das Risiko eines cholangiozellulären Karzinoms ist bei gleichzeitig vorliegender primär sklerosierender Cholangitis (PSC) erhöht. Als seltene Spätkomplikation gilt die Amyloidose [1, 6].

Verlauf der Colitis ulcerosa

Es sind drei Verlaufsformen der Colitis ulcerosa beschrieben.

1. Der chronisch-rezidivierende Verlauf (85 %):

In der chronisch-rezidivierenden Verlaufsform wechseln sich rezidivierende Exazerbationen mit Zeiten kompletter Remission ab. 5-10 % der Patienten bleiben nach einem einzigen Krankheitsschub für viele Jahre beschwerdefrei. Bei diesem Verlaufstyp beschränkt sich die Erkrankung oft auf das Rektum, Sigma und distales Kolon [1].

2. Chronisch-kontinuierlicher Verlauf (10 %):

In der chronisch-kontinuierlichen Verlaufsform findet keine komplette Remission statt und die Beschwerden unterschiedlicher Intensität halten ohne Zeiten der Beschwerdefreiheit an [1].

3. Akuter fulminanter Verlauf (5 %):

Charakterisiert wird der akute fulminante Verlauf durch einen plötzlichen Krankheitsbeginn mit Tenesmen und Durchfällen, septischen Körpertemperaturen, Dehydratation und Schock. Hier sind mögliche Komplikationen die toxische Kolondilatation mit Überblähung des Abdomens, Peritonitis und Perforationsgefahr. Die Letalität liegt bei 30 % [1].

Diagnose und Therapie

Eine Diagnosestellung erfolgt in Stufen und erfolgt beginnend mit Anamnese und Klinik. Weiter werden eine Inspektion des Anus, sowie eine digitale rektale Untersuchung vorgenommen [1, 2].

Darauffolgend findet eine komplette Ileokoloskopie mit Stufenbiopsie in mehreren Kolonabschnitten statt, um die sichere Diagnose einer Colitis ulcerosa stellen zu können.[1, 2] Der nächste Schritt ist eine Kontroll-Koloskopie zur Früherkennung eines kolorektalen Karzinoms [1]. Sonografisch kann eventuell eine diffuse Wandverdickung des Kolons zu einer Erhärtung des Verdachts führen [1].

Als Laborparameter werden Entzündungsparameter, wie die Konzentration des C-Reaktiven Proteins (CRP) und die Blutsenkungsgeschwindigkeit gemessen [1]. Desweiteren sollten die

Laborparamter den Eisenhaushalt, Nierenfunktionsparamter, Transaminasen und Cholestaseparamter enthalten [2].

Calprotectin und Lactoferrin im Stuhl sind ebenfalls Marker der Schleimhautentzündung. Bei erhöhter γ -GT/AP muss eine primär sklerosierende Cholangitis ausgeschlossen werden. Eine bakteriologische Stuhluntersuchung dient dem Ausschluss einer infektiösen Kolitis. Zudem sollte auch auf das Clostridium difficile-Toxin untersucht werden [1, 2].

In Tabelle 1 ist eine Übersicht der klinischen Symptome, mögliche Lokalisationen und Komplikationen sowie Laborbefunde modifiziert nach Podolsky *et al.* [6]

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Charakteristika bei Colitis ulcerosa modifiziert nach Podolsky *et al.* [6]

Merkmal	Colitis ulcerosa
Klinisches Symptome	
Fieber	recht häufig
Abdominalschmerz	variiert
Diarrhoe	sehr häufig
Rektale Blutungen	sehr häufig
Gewichtsverlust	recht häufig
Anzeichen der Mangelernährung	recht häufig
Perianale Erkrankung	fehlend
Abdominale Masse	fehlend
Wachstumsverzögerung bei Kinder und Jugendlichen	gelegentlich
Lokalisation	
Kolon	ausschließlich
Ileum	nie
Jejunum	nie
Magen oder Duodenum	nie
Oesophagus	nie
Intestinale Komplikationen	
Strikturen	unbekannt
Fisteln	fehlend
Toxisches Megakolon	unbekannt
Perforationen	unbekannt
Kanzeröse Entartungen	häufig
Endoskopische Befunde	
Brüchiges Gewebe	sehr häufig
Aphtöse und lineare Ulzerationen	fehlend
Kopfsteinpflasterartige Veränderungen	fehlend
Pseudopolypen	häufig
Rektale Beteiligung	sehr häufig
Radiologische Befunde	
Verteilung	kontinuierlich
Ulzerationen	leicht, oberflächlich
Fissuren	fehlend
Strikturen oder Fisteln	selten
Beteiligung des Ileums	dilatiert "Retrograde Ileitis"

Die Therapie der Colitis ulcerosa ist abhängig zum einen, von der Lokalisation und zum anderen, vom Schweregrad der Entzündung. Desweiteren unterscheidet man nach diätetischen Maßnahmen, der medikamentösen Therapie, psychosomatischer Hilfe und chirurgischen Interventionen [1].

Die diätetischen Maßnahmen erfolgen ähnlich wie bei Morbus Crohn-Patienten. So wird bei Nahrungsmitteln die der Patient nicht verträgt eine Eliminationsdiät betrieben und eine professionelle Ernährungsberatung durchgeführt. Bei Malabsorptionen erfolgt eine supplementäre Ernährung je nach Mangel [1].

Bei einer medikamentösen Therapie wird danach unterschieden, ob man eine Remissionsinduktion, oder einen Remissionserhalt anstrebt [1].

Zur Remissionsinduktion stehen Mesalazin, Kortikosteroide, Immunsuppressiva oder Biologicals zur Verfügung [1, 4, 7]. Biologicals haben durch ihre direkte Interaktion mit dem Immunsystem jedoch häufig unvorhergesehene Nebenwirkungen auf das Immunsystem, wie Überstimulierung, Hypersensivität, Immundeviation und Kreuzreaktionen [8]. Mesalazin als Retardpräparat der 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) wird zur Standardtherapie bei milder bis mäßig aktiver Colitis ulcerosa [2] und zur Schubprophylaxe verwendet. Bei Erreichen der Remission verringert es die Schubhäufigkeit [1, 7, 9]. Kortikosteroide werden als systemisch wirksame und topisch wirksame Steroide verwendet. Systemisch wirksame Steroide werden bei mittelschweren bis schweren Schüben angewandt, jedoch sollte das Risiko einer durch Kortikosteroid bedingten maskierten Perforation nicht unbeachtet bleiben [1, 2, 4]. Topisch wirksame Steroide werden bei isolierter, distaler Kolitis oder Proktitis als Klysmen oder Rektalschaum verwandt [7], sind jedoch geringfügig schwächer wirksam als Mesalazin [1, 4]. Immunsuppressiva sollten nur eingesetzt werden wenn vorher ein Screening auf Tuberkulose, Hepatitis B und C stattgefunden hat [1, 2]. Azathioprin kommt bei therapierefraktären chronischen Verläufen zum Einsatz und führt zu einem Absinken der Schubfrequenz [1]. Cyclosporin A kommt bei steroidrefraktären hochakuten Schüben einer Kolitis zur Anwendung. Tacrolimus dient als Reservemittel [1, 2, 4].

Biologicals oder Anti-TNF- α Therapie dient als Reservemedikament bei mittelschweren bis schweren Colitis ulcerosa-Fällen, falls eine Steroidtherapie und Immunsuppressiva keinen Therapieerfolg zeigen [1, 4, 10, 11].

Zur Remissionserhaltung wird langfristig 5-ASA verwendet [1, 2], was ebenfalls die Wahrscheinlichkeit eines kolorektalen Karzinoms verringert [1, 2, 5]. Falls hier eine Unverträglichkeit herrscht wird eine E.coli Nissle-Präparat eingesetzt [1, 2, 9].

Zur Remissionserhaltung nach einem fulminanten Schub und durch Cyclosporin A induzierter Remission, häufigen Rezidiven [1] oder einer Steroidabhängigkeit wird Azathioprin verwandt [1, 12].

Nachfolgend sind in Tabelle 2 medikamentelle Therapieoptionen bezogen auf Verlauf, Remissionsstatus und Lokalisation zusammengefasst (modifiziert nach Podolsky et al).

Tabelle 2: Medikamentelle Therapieoptionen bei Colitis ulcerosa (modifiziert nach Podolsky *et al.*) [6]

Verlauf	Distale Colitis ulcerosa	Extensive Colitis ulcerosa
leichter Verlauf	Oral oder rektal Aminosalazylate; Rektal Kortikosteroide	Oral Aminosalazylate
moderater Verlauf	Oral oder rektal Aminosalazylate; Rektal Kortikosteroide	Oral Aminosalazylate
schwerer Verlauf	Oral oder parenteral Aminosalazylate; Rektal Kortikosteroide	Oral oder parenteral Aminosalazylate; Intravenös Cyclosporin
refraktärer Verlauf	Oral oder intravenös Kortikosteroide, zusätzlich zur oralen Behandlung Azathioprin oder Mercaptopurine	Oral oder intravenös Kortikosteroide, zusätzlich zur oralen Behandlung Azathioprin oder Mercaptopurine
Remission	Oral oder rektal Aminosalazylate; Oral Azathioprin oder Mercaptopurine	Oral Aminosalazylate; Oral Azathioprin oder Mercaptopurine

Chirurgische Intervention

Wenn bei einem schweren Schub die konservative Therapie nach 3 Tagen zu keiner Besserung führt, kann eine Kolektomie erwogen werden. Unterschieden wird in die akute Operationsindikation und die elektive Operationsindikation [1]. Als akute Operationsindikation gelten eine fulminante Kolitis mit Sepsis, das toxische Megakolon, Perforationen und schwere Blutungen [1, 2, 4]. Als elektive Operationsindikationen gelten schwere, rezidivierende Schübe, Verschlechterung des Allgemeinbefindens, eine durch

mindestens zwei Pathologen bestätigte Epitheldysplasie, kolorektale Karzinome [4], retardiertes Wachstum sowie lokale oder systemische Komplikationen [1].

Immunologie der Colitis ulcerosa

Die immunologischen Vorgänge der Colitis ulcerosa sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ähnlich wie Morbus Crohn, wird auch die Colitis ulcerosa unter Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) zusammengefasst, und wurde empirisch aus klinischen, radiologischen, pathologischen und endoskopischen Merkmalen heraus definiert [3, 13]. Der genaue Mechanismus der Entstehung der CED ist bisher unbekannt, jedoch wird vermutet, dass es sich meistens um eine unangebrachte, oder chronische Immunantwort auf die intestinale mikrobiologische Flora von genetisch anfälligen Patienten handelt [14]. Diese Theorie wird in Abbildung 1 dargestellt. Dabei zeigen aktuelle Erkenntnisse unter anderem von Geremia *et al.*, dass neben dem adaptiven Immunsystem, auch das angeborene Immunsystem bei den CED eine wichtige Rolle spielt [14].

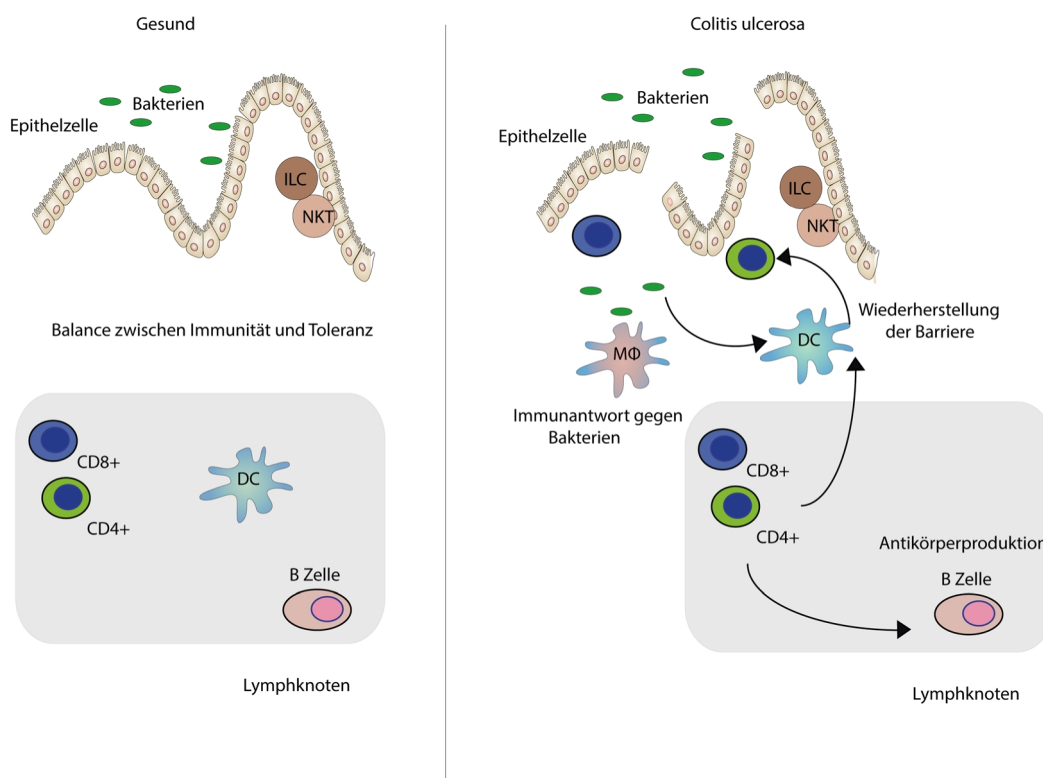


Abb. 1: Theorie der wichtigsten immunologischen Vorgänge in der Entwicklung der Colitis ulcerosa. Links wird die funktionelle Darmbarriere verdeutlicht. Im rechten Teil der Grafik wird die Theorie der Barrierestörung durch Colitis ulcerosa verdeutlicht. Bakterien dringen hier durch die Darmbarriere und aktivieren das immunologische Kompartiment.

Die Abwehr von Pathogenen im Darm kann man in verschiedene „Verteidigungslinien“ unterteilen [14]. Die erste physikalische Barriere stellt die Mukusschicht [14, 15] dar, die aus

einer äußeren von kommensalen Bakterien bevölkerten, lockeren Schicht besteht. Anschließend findet sich eine, von Becherzellen sezernierte, feste und sterile Schicht aus polymerisierten Muzinen [14].

Als zweite physikalische Barriere dient die Epithelschicht, die aus Enterozyten und spezialisierten Zellen, wie Becherzellen und Paneth-Zellen besteht. Die Barriereintegrität, die von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-17 , Chemokinen und der Kommunikation der Immunzellen untereinander reguliert wird, erfolgt unter anderem durch sogenannte tight junctions [14]. Eine gestörte Barriereintegrität wird sowohl bei Colitis ulcerosa-Patienten, als auch bei Morbus Crohn-Patienten beobachtet. Jedoch ist bisher noch unklar, ob die erhöhte Permeabilität der Darmwand die Ursache, oder eine Folge der chronischen Entzündung ist [14].

Die Zellen des angeborenen Immunsystems wie dendritische Zellen, Makrophagen und manche Epithelzellen sind für eine schnelle Antwort auf Erreger notwendig, da sie die mikrobiologische Flora erkennen und bei nicht physiologischen Oberflächenmolekülen, sogenannten PAMPS (pathogen associated molecular patterns) eine schnelle effektive Antwort gegen das Pathogen einleiten können. Die pathogenen Oberflächenmoleküle (PAMPs) werden über sogenannte pattern recognition receptors (PRRs) erkannt [14]. Makrophagen als Hauptpopulation von gewebeständigen mononuklearen Zellen, spielen eine Rolle bei Erkennung und Elimination von bakteriellen Erregern, sowie bei der Vernetzung mit dem adaptiven Immunsystem [15]. Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen und damit bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems [14]. Neben der rein physikalischen Barriere können intestinale Epithelzellen auch Defensine sezernieren, wobei α -Defensine von Paneth-Zellen und β -Defensine durch die meisten Epithelzellen sezerniert werden [14, 16]. Diese Defensine werden entweder ständig sezerniert, oder erst durch eine Bindung von PAMPs an PRRs [14]. Bei Colitis ulcerosa, nicht aber bei Morbus Crohn, wird von erhöhten Werten von β -Defensinen 2 und 3 berichtet [16, 17].

Zu den PRRs zählen zum einen Toll like Rezeptoren (TLRs) aber auch NOD-like Rezeptoren (NLRs / Nucleotid binding oligomerization domain) [14, 15]. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt über eine Signalkaskade zu einer Aktivierung des nuclear factor (NF)- κB , die durch eine anschließende Gentranskription zu der Produktion proentzündlicher Mediatoren führt [14]. Ein weiterer Effekt der Aktivierung der PRRs ist, dass die Reifung antigenpräsentierender Zellen durch Hochregulation co-stimulierender Moleküle- die für

eine effektivere Antigenpräsentation und damit verbundene T-Zellaktivierung notwendig sind-eingeleitet wird. Interleukin (IL) 23 als Schlüsselzytokin bei der Kommunikation zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem spielt eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort des Darmes. Ein IL-23R Gen-Polymorphismus, der den IL-23 Rezeptor kodiert, wird mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn assoziiert [14]. So hat IL-23 sowohl Einfluss auf Th17-Zellen, als auch auf andere Zellpopulation, wie zum Beispiel $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und mukosaassoziierte invariant T-Zellen die im mukosahaltigem Gewebe repräsentiert sind und ebenfalls Th17 Zytokine sezernieren. So haben beispielsweise Buonocore *et al.* durch IL-23 aktivierte innate lymphoid cells (ILC) identifiziert, die je nach Versuchsmodell, durch eine durch IL-17A oder IFN- γ bedingte intestinale Entzündung entstanden sind [18]. Xavier *et al.* postulieren, dass obwohl eine Reaktion des angeborenen Immunsystems eine Voraussetzung für die Entwicklung der CED zu sein scheint, es doch wahrscheinlicher ist, dass das adaptive Immunsystem die treibende Kraft bei der Entzündung des Gewebes darstellt [13].

Das erworbene (adaptive) Immunsystem ist im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem hochspezifisch und seine Bestandteile interagieren sowohl mit den Zellen des angeborenen Immunsystems, als auch untereinander [14]. So wird die erworbene Immunantwort durch vorhandene, aber auch durch rekrutierte Zellpopulationen beeinflusst, die unter anderem mukosale B-zellen beinhalten, die IgA und IgG sezernieren [13]. T-Zellen spielen eine zentrale Rolle innerhalb des erworbenen Immunsystems und in den immunologischen Vorgängen der CED. So können naive T-Zellen (Th0) aktiviert werden und sich entweder zu Th1, Th2 Zellen oder zu Th17 differenzieren. Dies ist ein wichtiger regulatorischer Prozess, der zur Beseitigung von Pathogenen beiträgt. Th1 Zellen sind dabei essenziell bei der Beseitigung intrazellulärer Pathogene wie Viren, wohingegen Th2 Zellen dem Schutz gegenüber Parasiten dienen und bei allergischen Reaktionen eine Rolle spielen. Die Entwicklung zu Th1, wird durch IL-12 und IFN- γ induziert und erfolgt über Stat1, TBX21 und Stat4 [13]. Th1-Zellen produzieren hohe Mengen von IFN- γ [13, 14].

Eine Th2 Immunantwort ist durch Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 Zytokinen charakterisiert. Diese Zytokine werden durch dendritische Zellen, polarisierte Th2 Zellen und intraepitheliale Lymphozyten des Typs 2 sezerniert [19]. Gemeinsam schaffen diese Zytokine eine Milieu, das einer Polarisierung der Monozyten in Richtung M2 Differenzierung verhilft, Eosinophile und Mastzellen reifen lässt und B-Zellen zur Proliferation und IgE Antikörperproduktion anregt [19].

Diese Art der Immunantwort ist für viele mukokutane Erkrankungen charakteristisch [19]. Die Induktion der Th2 Antwort erfolgt durch die Polarisation der Immunzellen durch die epithelsezernierten Zytokine, IL-33 und IL-25. Zwei experimentelle Tiermodelle der Kolitis, das Modell der IL-10 Defizienz sowie das Modell der Dextran sodium sulfate (DSS)-induzierten Kolitis zeigten, dass IL33 in hohen Mengen exprimiert wird und eine Th2 Antwort initiiert, indem es den Transkriptionsfaktor GATA3 in T-Zellen des Kolons induziert [20].

Th2 Zellen sind die wichtigsten Träger der Immunantwort und ihre Funktionen werden durch zwei Zytokine, IL-4 und IL-13 vermittelt. Beide Zytokine werden durch GATA3⁺ Th2 sezerniert und ihre Frequenz korreliert mit dem Schweregrad der experimentellen DSS-Kolitis [21]. Die Entstehung der Th2 Zellen ist an den Transkriptionsfaktor STAT6 gekoppelt und STAT6 defiziente Zellen können nicht in Richtung Th2 polarisiert werden. Zusätzlich kann in Mäusen mit einer STAT6 Defizienz, keine Kolitis-ähnliche Symptomatik mit Oxazolon induziert werden [22]. NK-T-Zellen, die STAT6-defizient sind, sind nicht in der Lage IL-13 im Oxazolon Model zu produzieren [22, 23].

Th17 Zellen sind bei der Beseitigung von extrazellulärer Bakterien und Pilzen ebenfalls beteiligt und sezernieren IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 [14]. Th17 Zellen sind eine CD4⁺ T-Zell Untergruppe, deren Differenzierung durch eine Kombination von IL-6 und TGF- β (Transforming growth factor) induziert wird. Die Expansion von Th17 Zellen wird durch IL-23 gefördert [13, 14], während die Inhibition durch Transkriptionsfaktoren der Th1 und Th2 Zellen erfolgt [13]. Durch Th17 Zellen produziertes IL-21 erhöht ebenfalls die Expression von IL-23 Rezeptoren [14].

Eine Dysregulation der T-Zellantwort durch eine abnormale Entwicklung aktivierter T-Zell Subtypen führt zu einer exzessiven Sekretion von Chemokinen und Zytokinen, die Einfluss auf Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems haben [14].

Unter den CED wird Morbus Crohn hauptsächlich durch eine Th1-Immunantwort charakterisiert [13], im Gegensatz zu der Colitis ulcerosa, die durch Interleukin IL-13 charakterisiert ist, welches hauptsächlich der Th2-Immunantwort zugerechnet wird [13]. IL-13 kann durch die Induktion von Epithelschäden eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität bewirken [14, 24, 25]. Weiter wurde gezeigt, dass die NK-T-Zellen der Colitis ulcerosa-Patienten durch IL-13 aktiviert werden können und in einen zytotoxischen Phänotyp übergehen [26].

Eine Blockade der Induktion einer Th2 Antwort und die Blockade des IL-4/IL-13 Signalwegs ist von großem therapeutischem Interesse in der Colitis ulcerosa-Behandlung. Aus diesem Grund wurde die Testung eines Th2-Inhibitors, in dem humansiertem Mausmodell der Colitis ulcerosa, in die wissenschaftliche Fragestellung dieser Arbeit mit eingebunden.

Funktionen von T-Zell sezernierten Zytokinen in der Mucosa von CED

Zytokine die durch verschiedene proentzündliche T-Zellen sezerniert werden sind zentrale Mediatoren der Läsionen in der entzündeten Mucosa der CED [14].

Das von Th1 Zellen sezernierte IFN- γ induziert die Apoptose von Enterozyten und die Ausschüttung von TNF- α durch aktivierte in der Darmmucosa sitzenden Makrophagen [14]. Th1 Zellen sind eine wichtige Quelle für TNF- α welches als zentrales Zytokin die Differenzierung stromaler Zellen in Myofibroblasten induziert und die Produktion von Matrix Metalloproteasen (MMPs) fördert [14]. Bei Matrix Metalloproteasen handelt es sich um ein gewebeschädigendes Enzym, dass die Apoptose von Enterozyten, durch die Verdauung der Basalmembran induziert [14]. Zudem verbindet TNF- α das angeborene mit dem adaptivem Immunsystem und hat eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der CED [14].

Das durch Th17 Zellen sezernierte IL-17A induziert die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung und die Produktion proentzündlicher Zytokine durch Makrophagen [14]. Neben der proentzündlichen Komponente hat IL-17A auch eine protektive Wirkung auf den Darm, was eine mögliche Ursache für den fehlenden Erfolg eines anti-IL-17A Antikörpers bei Morbus Crohn-Patienten sein könnte [14].

Tiermodelle in der Forschung

Schon seit langem helfen Tiermodelle beim Verstehen von Erkrankungen und Optimieren der Therapie für den Menschen, doch ist eine direkte Übertragung auf den Menschen nur eingeschränkt möglich, da zahlreiche Unterschiede in der Physiologie, unter anderem bei Rezeptorstrukturen und Signalkaskaden vorliegen [27].

Das wohl genaueste Tiermodell um den menschlichen Gegebenheiten und Reaktionen innerhalb des Organismus nahe zu kommen, wären Versuche in nichthumanen Primaten, die jedoch aufgrund ethischer und praktischer Bedenken immer weniger zur Anwendung kommen. An ihre Stelle rückten Versuche mit sinnesphysiologisch niedriger entwickelten Tieren wie Ratten und Mäusen, die in mancher Hinsicht, gegenüber nichthumanen Primaten Nachteile aufweisen, in anderen Aspekten jedoch positiv hervorstechen.

Als Vorteil darf man die finanziellen Aspekte nennen, die nicht nur durch geringere Anschaffungskosten, sondern auch durch geringere Haltungs- und Reproduktionskosten zum Tragen kommen. Durch geringere Reproduktionskosten, sowie Reproduktionszeiten der Mäuse lassen sich größere Versuchskohorten, sowie mehr Versuche in einem bestimmten Zeitraum durchführen, um die Aussagekraft der Versuche zu optimieren. Die geringere Lebenserwartung der Mäuse führt jedoch zu Einschränkungen hinsichtlich der Versuchslänge was Langzeitversuche schwierig macht [28]. Das größte Problem der Tierversuche mit Mäusen ist jedoch ihre beschränkte Übertragbarkeit zu bestimmten Themen wie beispielsweise neurowissenschaftliche, oder immunologische Prozesse, da Physiologie, Botenstoffe und Rezeptoren den humanen nicht immer gleichen. In den letzten Jahren konnte auf dem Feld der Immunologie jedoch eine vielversprechende Alternative gefunden werden, um die Versuche mit sinnesphysiologisch höher entwickelten Tieren zu umgehen [29-32].

Mausmodelle mit humanisiertem Immunsystem bieten uns die Option, innerhalb bestimmter Grenzen, die im Mensch ablaufenden immunologischen Vorgänge nachvollziehen zu können, und auf humane Zielzellen therapeutisch Einfluss nehmen zu können, ohne auf Tierexperimente mit nichthumanen Primaten, oder die Entwicklung von Surrogatemolekülen zurückgreifen zu müssen [30-32]. Einschränkungen erfahren diese Modelle jedoch durch die vorher schon erwähnte eingeschränkte Lebenserwartung von Mäusen, als auch durch potentiell auftretende Abstoßungsreaktionen der Maus gegenüber den humanen Zellen [33, 34].

Tiermodelle der Colitis ulcerosa

Bei den durch haptenisierende Agenzien induzierten Kolitiden in Mäusen handelt es sich um eine hilfreiche Methode, um bestimmte chronisch entzündliche Darmerkrankungen nachvollziehen zu können [35]. So bildet die Induktion einer Colitis, mittels Dextransulfat in der immunkompetenten BALB/c Maus, nahezu das identische klinische und histologische Bild der Colitis ulcerosa ab. Die mit Abstand am häufigsten in diesem Modell beschriebene Veränderung ist eine Verkürzung des Kolons [36]. Vor dem Hintergrund der Humanisierung des Immunsystems der Maus, um die Reaktion des Spenderhintergrundes auf Reiz und Therapie betrachten zu können, sind derzeit 2 Mausmodelle beschrieben [29, 30].

Oxazolon-induzierte Kolitis bei der Maus

Das von Heller *et al.* beschriebene Modell einer Oxazolon induzierten Kolitis ist ein Mausmodell, dass die Th2 Reaktion der humanen Kolitis widerspiegelt. Das Prinzip beruht

auf einer Th2 Antwort, die durch intrarektale Applikation des haptenisierenden Agens Oxazolon in einem Alkohol-Gemisch induziert wird [29].

Die Anfangsdosis führt zu einer Flutung der Lamina propria mit Oxazolon oder Oxazolon-modifiziertem bakteriellem Antigen, was nachfolgend eine immunologische Antwort und weitere Entzündungen hervorbringt. Diese Entzündung wird durch Th2 Zytokine, vor allem IL-4, IL-5 und IL-13, dominiert, wobei die entstehende Entzündung durch Anti-IL4 monoklonale Antikörper gemildert werden kann [29, 35, 37].

Der Mechanismus, durch den das luminale Antigen in der Mucosa der Oxazolon induzierten Kolitis der Maus eine immunologische hervorruft, ist noch ungeklärt. Es werden derzeit zwei Möglichkeiten diskutiert. Die eine wäre durch MHC Klasse II reaktive CD4⁺ T-Zellen, die bei der Th2 Kolitis eine wichtige Rolle spielen, die andere dass NK-T-Zellen die Entzündung vermitteln. Heller *et. al.* zeigen in ihren Versuchen, dass NK-T-Zellen die Entzündung bei der Oxazolon induzierten Colitis der Maus vermitteln und dass diese Zellen große Mengen Th2 Zytokine sezernieren wenn sie mit antiCD3/antiCD28 stimuliert werden [29].

Diese Antwort besteht aus einer IL-4 Sekretion, die aber zu einer bald überwiegenden IL-13 Sekretion übergeht. Heller *et al.* beschreiben, dass es sich bei IL-13 um eine essentielle pathogenitätsinduzierende Komponente handelt, da mit einer Inhibition durch IL13R α 2-Fc Krankheitssymptome verhindert werden können. Dieses Fusionsprotein bindet mit hoher Affinität an IL-13 und neutralisiert die IL-13 Bioaktivität in vitro und in vivo [29, 38, 39].

Anhand der Ergebnisse der Oxazolon induzierten Colitis in Mäusen, ergeben sich wichtige Erkenntnisse über die Colitis ulcerosa beim Menschen [29].

Durch die rektale Gabe von 3% Oxazolon bei naiven Mäusen haben Heller *et al.*, eine Th2 Antwort in der Lamina propria des Kolons ausgelöst, die Oxazolon Colitis genannt wird [29, 35]. Da diese Dosis jedoch hoch toxisch ist und eine beschleunigte Entzündung, die 3-4 Tage dauert, auslöst, haben Heller *et al.* das Versuchsprotokoll geändert, um eine länger andauernde chronische Entzündung zu erhalten [29].

Hierbei wurden C57BL/10 Mäuse mit 3 % Oxazolon durch kutane Applikation 5 Tage vor der rektalen Applikation von 1 % Oxazolon präsensitiviert. Diese mit 1 % Oxazolon behandelten präsensitivierten Tiere zeigten nach der rekalen Applikation Gewichtsverluste, die manchmal zum Tode führten, während nicht-präsensitivierte Tiere die rektal einen Reiz durch 1 %

Oxazolon erfuhren, Gewichtsverluste zeigten, die dem Gewichtsverlust von Tieren glichen, die nur mit Lösungsmittel (Ethanol) behandelt worden sind [29].

Mäuse, die ausschließlich rektal einem Reiz durch 3% Oxazolon ausgesetzt wurden, zeigten nur einen vorübergehenden Gewichtsverlust. Dies war damit zu erklären, dass es sich hierbei um die überlebenden Tiere handelte, die nur milde Symptome zeigten, während der Hauptteil der Tiere zu schnell verstarb [29].

Kutane Sensitivierung mit Oxazolon induziert eine CD4⁺ T-Zell vermittelte Hypersensitivität nicht nur in der Haut, sondern auch in der gastrointestinalen Mucosa [29]. Die Reaktion im Darm verlief weit fulminanter als in der Haut [29].

Histologisch zeigten die präsensitivierten Tiere massive Ödeme in der Darmwand und eine dichte Infiltration von polynuklearen Granulozyten in den oberflächlichen Schichten der Mucosa. Dieses Bild spiegelt histologisch die humane Colitis ulcerosa wieder und legt nahe, dass ähnliche pathologische Mechanismen bei beiden Entzündungstypen zu den Gewebeschäden führen [29].

Mononukleare Zellen isoliert aus der Lamina propria, mesenterialen Lymphknoten oder der Milz von Mäusen mit Oxazolon Colitis produzierten große Mengen an Th2 Zytokinen (IL-4, IL-13, IL-5), aber nur geringe Mengen von IFN- γ nach einer Stimulierung mit Anti-CD3 und Anti-CD28 Antikörpern in vitro [29].

Heller *et al.* zeigten, dass NK und NK-T Zellen essentiell sind, um eine Oxazolon Colitis bei Mäusen zu induzieren, da Mäuse, bei denen durch repetitive monoklonale Anti-Nk1.1 Antikörper Gabe, die NK- und NK-T-Zellen depletiert wurden, keinerlei klinische oder histologische Veränderungen zeigten [29].

Oxazolon induzierte Colitis bei NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen

Entwicklung

In diesem Mausmodell wurden die von Leonard D. Shultz *et al.* 2005 in den Jackson Laboratories in Bar Harbor gezüchteten Mäuse vom NOD.Cg.Prkdc^{Scid}IL2rg^{tmWjl}/Sz-Stamm verwendet, die abgekürzt als NOD-scid R γ -chain^{null} bezeichnet werden. Diese Mäuse entstanden durch mehrere Kreuzungen verschiedener Stämme [40].

Zuallererst wurden NOD-scid Weibchen mit B6.129S4-IL2R γ ^{tm1Wjl}-Böcken verpaart. Da sich die IL-2R γ Mutation auf dem X-Chromosom befindet wurden die (NOD X B6)F1 +scid IL2R γ -chain^{null} hemizygoten Nachkommen mit NOD-scid Weibchen zurückgekreuzt [40].

Nach zwei weiteren Rückkreuzungsgenerationen wurden die homozygot Scid und heterozygot IL2R γ^{null} tragenden Weibchen durch Durchflusszytometrie und Polymerasekettenreaktion (PCR) identifiziert. Nach Rückkreuzung des IL2R γ^{null} Allels für 8 weitere Generationen auf den NOD-scid Hintergrund wurden NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2R $\gamma^{\text{Tm1Wjl/Sz}}$ Weibchen mit NOD-scid IL2R $\gamma^{\text{Null/y}}$ Böcken gekreuzt [40].

Die weibliche und männliche NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Nachkommenschaft wurde durch quantitative PCR identifiziert und das Fehlen der IL-2R γ -chain Expression auf peripheren Blutzellen durch Durchflusszytometrie bestätigt [40].

Eigenschaften der NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäuse

In der histologischen Analyse zeigen die Tiere den kompletten Verlust der follikulären Struktur in der Milz. Der Thymus der Tiere ist hochgradig hypoplastisch und hat keinen definierten Cortex mehr. Des Weiteren zeigt er zystische Strukturen. Die Lymphknoten der Tiere sind ebenfalls hochgradig hypoplastisch [40].

NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäuse können keine reifen Lymphozyten (CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ T-Zellen und B220⁺Igk⁺ B-Zellen) bilden und im Gegensatz zu NOD-scid auch keine NK Zellen (LGL⁺ CD122⁺). Sie leben durchschnittlich länger als 16 Monate und zeigen auch bei sublethaler Bestrahlung Resistenzen gegenüber Lymphomentwicklung [40].

In der Milz gefundene zellkernhaltige Zellen exprimierten MHC Klasse I. Demgegenüber zeigten sich nur geringe Prozentzahlen die MHC Klasse II exprimierten [40].

Wie bereits durch Shultz *et al.* dargestellt, finden sich bei NOD-scid Mäusen auch Defizite in der myeloiden Population. So zeigen auch die von NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen gewonnenen dendritischen Zellen in Zellkultur eine abnormal geringe Produktion von TNF- α und von CD86-Expression. Die Analysen der Zellüberstände offenbarten auch eine fehlende Produktion an IL12p40 und IFN- γ [40].

Beschriebene Vorgänge in der Oxazolone induzierten Colitis in Mäusen mit humanisiertem Immunsystem

In der Arbeit von Nolte *et al.* wurde erstmals die Induktion einer Colitis durch Oxazolone in einer Maus mit humanisiertem Immunsystem beschrieben [30]. Dieses Modell hat unter anderem den Vorteil, dass Medikamente gegen humane Zielmoleküle in-vivo getestet werden können. Dies ist dann wichtig, wenn sich die Sekundärstrukturen der Liganden und Rezeptoren in Maus und Mensch stark unterscheiden oder Signalkaden speziesspezifisch sind [30].

Hier konnte gezeigt werden, dass die rekonstituierten und mit Oxazolol behandelten Mäuse die gleichen Symptome wie die immunkompetenten mit Oxazolol behandelten Mäuse entwickelten. Diese Symptome waren durch Gewichtsverlust, Diarrhoe, sowie eine veränderte Kolonarchitektur gekennzeichnet. Die histologische Untersuchung zeigte den Einstrom von inflammatorischen Zellen in die Lamina propria, Ödembildung und Verlust der Krypten durch Fibrose [30]. Durch immunhistochemische Untersuchung konnte der Einstrom von humanen T-Zellen nachgewiesen werden und durch FACS Analyse wurde ein hoher Prozentsatz der infiltrierten T-Zellen im Kolon als NK-T-Zellen identifiziert. NK-T-Zellen werden als Hauptquelle von IL-13 in Oxazolol Colitis angesehen [29, 30, 37]. Dieses von Th2 Zytokinen geprägte inflammatorische Milieu zeigte sich auch in der vermehrten Expression von hIgE und Periostin [30]. Die Expression von hIgE wird sowohl durch IL-4 als auch IL-13 induziert, die Expression von Periostin wird durch IL-13 kontrolliert [41].

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass Oxazolol sich in nicht rekonstituierten Mäusen toxisch zeigte und vermutlich eine Sepsis auslöste [30]. Dies deutet darauf hin, dass die ausgelöste Immunantwort in den rekonstituierten und immun-kompetenten Mäusen eine Reaktion auf den toxischen Reiz des Oxazolols war und nicht auf eine haptenisierende Wirkung zurückzuführen ist [30].

Die Rekonstitution der Mäuse mit humanen PBMCs ohne weitere Behandlung war nicht ausreichend, um die Symptome einer Kolitis in den Mäusen auszulösen, jedoch zeigten rekonstituierte Mäusen, denen rektal Ethanol appliziert wurde, klinische Symptome die einer Kolitis glichen [30]. Ethanol ohne Oxazolol wurde in immun-kompetenten Mäusen in der Kontrollgruppe rektal gegeben und löste in diesen Mäusen keine Reaktion aus [30]. In den rekonstituierten Mäusen spielte der Spenderhintergrund eine wesentlich Rolle. So zeigten Mäuse die mit den PBMCs eines an Colitis ulcerosa erkrankten Spenders immun-rekonstituiert wurden einen höheren histologischen Score als Mäuse, die mit PBMCs eines gesunden Spenders rekonstituiert waren [30].

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die hPBMCs das „immunologische Gedächtnis“ des Spenders mitbringen und dadurch prädestiniert sind, auf den toxischen Reiz durch Ethanol zu reagieren [30].

Ethanol induzierte Kolitis in den NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen mit humanisiertem Immunsystem

Die Resultate des durch Nolte *et al.* beschriebenen Tiermodelles gaben Grund zur Annahme, dass Ethanol als Vehikel der Oxazolone Colitis bei rekonstituierten NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen ausreichen würde, um ein verlässliches Mausmodell der Colitis ulcerosa abzubilden [30].

In diesem Tiermodell werden NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäuse mit hPBMCs von an Colitis ulcerosa erkrankten Patienten rekonstituiert und mit Ethanol eine Immunantwort ausgelöst, die dem Erkrankungsbild der Colitis ulcerosa stark ähnelt, aber den toxischen Effekt durch die Oxazolone Behandlung [30] vermeidet. Zu den induzierten Symptomen gehören die Entwicklung einer Diarrhoe, der Einstrom von entzündlichen Zellen in die Mukosa und die Veränderung der Darmarchitektur, die den Rückschluss auf die Wirkung von Th2 Zytokinen zuließ [30]. Im Gegensatz zur humanen Colitis, die nicht durch IgE Expression gekennzeichnet ist, konnte in den Tierversuchen eine Erhöhung der hIgE Expression nachgewiesen werden [30], was ein Hinweis für ein Th2-dominiertes entzündliches Milieu ist.

Ein wichtiger Beweis dafür, dass die Entwicklung der Symptome und die phänotypischen Veränderungen in diesem Modell ihre Ursache in der Aktivierung der immunologischen Zellen durch den Reiz mit Ethanol haben, ist die Hemmung der entzündlich Abläufe mit Prednisolon. Prednisolon ist ein gängiges Therapeutikum mit immunsuppressiver Wirkung,

Da Colitis ulcerosa zu den TH2-charakterisierten entzündlichen Erkrankungen gehört, in der dem regulatorisch wirkenden IL-4 und dem Effektorzytokin IL-13 wesentliche pathogene Wirkungen zugeschrieben werden [35, 37], könnte eine Hemmung dieser Signalkaskade durch einen spezifischen Inhibitor eine mögliche therapeutische Alternative sein. Aus diesem Grund wurde in diesem Modell ein Th2 Inhibitor getestet, der spezifisch auf die IL-4/IL-13 Signalkaskade hemmt.

Die Ziele und Hypothesen der Dissertation

Ziel 1. Die Validierung des Tiermodells für UC in Mäusen mit humanisiertem Immunsystem. Es sollte getestet werden, ob die Versuche mit verschiedenen Spendern repliziert werden können, und ob sich die Symptome mit einem gängigen Therapeutikum (Prednisolon) beheben lassen.

Hypothesen zu 1

1. Durch die Rekonstitution allein werden in den Kontrollgruppen keine Kolitis ähnlichen Symptome ausgelöst
 - 1.1. Wir erwarten einen geringen klinischen Aktivitätsscore in den Kontrollgruppen.
 - 1.2. Wir erwarten eine unveränderte Kolonlänge in den Kontrollgruppen.
 - 1.3. Wir erwarten keine histologische Veränderung des Darms in den Kontrollgruppen.
2. Durch die Rekonstitution allein werden die Immunzellen aktiviert
 - 2.1. Der Transfer der Immunzellen aktiviert die IgG Sekretion. Wir erwarten einen messbaren hIgG Serum Spiegel in beiden Kontrollgruppen.
 - 2.2. Durch den Transfer werden B- und T-Zellen aktiviert. Wir erwarten erhöhte Frequenzen von hCD19⁺hCD27⁺-, hCD4⁺hCD44⁺- und hCD8⁺hCD44⁺-Zellen in beiden Kontrollgruppen im Vergleich zu den PBMCs aus den Patienten.
3. Der Spenderhintergrund beeinflusst das entzündliche Profil der rekonstituierten Mäuse.
 - 3.1. Der Spenderhintergrund beeinflusst den Rekonstitutionsgrad, die Frequenz der B- und T-Zellen. Wir erwarten einen Unterschied im Rekonstitutionsgrad und in der Frequenz der hCD19⁺-, hCD4⁺- und hCD8⁺-Zellen in beiden Experimenten.
 - 3.2. Der Spenderhintergrund beeinflusst die hIgG und hIgE Sekretion. Wir erwarten unterschiedliche hIgG und hIgE Serumspiegel in beiden Experimenten.
4. Durch die rektale Gabe von Ethanol wird im Kolon eine Entzündung ausgelöst.
 - 4.1. Der Reiz mit Ethanol beeinflusst den Aktivitätsscore. Wir erwarten einem Anstieg des klinischen Aktivitätsscores in der Ethanol + NaCl-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.
 - 4.2. Der Reiz mit Ethanol beeinflusst die Darmlänge. Wir erwarten eine geringgradige Verkürzung des Kolons in der Ethanol + NaCl-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

- 4.3 Der Reiz mit Ethanol verursacht histologische Veränderungen im Kolon. Wir erwarten im Kolon histologische Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe.
 - 4.4 Der Reiz mit Ethanol beeinflusst den Rekonstitutionsgrad. Wir erwarten eine Abnahme der hCD45⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.
 - 4.5 Durch den Reiz mit Ethanol werden B-Zellen aktiviert und die hIgG und hIgE Sekretion nimmt zu. Wir erwarten eine erhöhte Frequenz der hCD19⁺ hCD27⁺ Zellen, sowie der hIgG und hIgE Sekretion in der Ethanol+NaCl Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.
 - 4.6 Durch den Reiz mit Ethanol werden hCD4 und hCD8 T-zellen expandiert. Wir erwarten eine erhöhte Frequenz der hCD4⁺ hCD8⁺-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.
- 5 Der Spenderhintergrund beeinflusst die Entwicklung der Symptome und die Antwort der Immun-Zellen auf den Reiz mit Ethanol.
 - 5.1 Der Spenderhintergrund beeinflusst den klinischen Aktivitätsscore. Wir erwarten einen geringfügigen Unterschied im klinischen Aktivitätsscore in der Ethanol + NaCl-Gruppe zwischen beiden Experimenten.
 - 5.2 Der Spenderhintergrund beeinflusst die hIgE und hIgG Sekretion. Wir erwarten einen Unterschied der hIgG- und hIgE Serumspiegel in beiden Experimenten.
 - 5.3 Der Spenderhintergrund beeinflusst die Frequenz der B-Zellen. Wir erwarten einen Unterschied in der Frequenz der hCD19⁺ Zellen.
 - 5.4 Der Spenderhintergrund beeinflusst die Frequenz der T-Zellen. Wir erwarten einen Unterschied in der Frequenz der hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen.
- 6 Die Verabreichung von Prednisolon vermindert die Entzündung und beeinflusst das entzündliche Profil.
 - 6.1 Wir erwarten eine Verringerung des klinischen Aktivitätsscores der Ethanol + Prednisolon-Gruppe gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe.
 - 6.2 Wir erwarten eine Milderung der Verkürzung des Kolons in der Ethanol + Prednisolon-Gruppe gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe.
 - 6.3 Wir erwarten eine mildere Veränderung des histologischen Bildes des Kolons in der Ethanol + Prednisolon-Gruppe gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe.
 - 6.4 Die Expansion und Aktivierung der B-Zellen wird durch Prednisolonbehandlung verhindert und die hIgG und hIgE Sekretion nimmt ab. Wir erwarten eine niedrigere Frequenz der hCD19⁺ und hCD19⁺hCD27⁺-Zellen in der Ethanol + Prednisolon-

Gruppe gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe, sowie ein Absinken der hIgG und hIgE Sekretion in der Ethanol + Prednisolon-Gruppe gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe.

- 6.5 Die Expansion der T-Zellen wird durch Prednisolonbehandlung verhindert. Wir erwarten eine niedrigere Frequenz der hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen in der Ethanol + Prednisolon-Gruppe im Vergleich zur Ethanol + NaCl-Gruppe.

Ziel 2: Die Testung eines neuen Inhibitors in diesem Tiermodell. Es sollte getestet werden, ob dieses Tiermodell dazu geeignet, dieser Inhibitor wirksam ist, und ob diese Wirkung mit der des Prednisolons vergleichbar ist.

Hypothesen zu Ziel 2

7. Der Th2-Inhibitor mindert die Entzündung und stellt eine Alternative zur Behandlung mit Prednisolon dar.
- 7.1. Der Th2-Inhibitor beeinflusst den klinischen Aktivitätsscore. Wir erwarten eine Verringerung des klinischen Aktivitätsscores der Ethanol + Th2-Inhibitor-Gruppe gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe.
- 7.2. Der Th2-Inhibitor beeinflusst die Veränderung der Darmlänge. Wir erwarten keine Veränderung der Kolonlänge gegenüber der Kontrollgruppe.
- 7.3. Der Th2-Inhibitor beeinflusst das histologische Bild des Kolons. Wir erwarten keine Veränderung des histologischen Bildes gegenüber der Kontrollgruppe.
- 7.4. Der Th2-Inhibitor beeinflusst den Rekonstitutionsgrad. Wir erwarten einen Unterschied hinsichtlich der hCD45⁺ Frequenz im Vergleich zur Ethanol + NaCl-Gruppe, sowie keinen Unterschied im Vergleich zur Ethanol + Prednisolon-Gruppe.
- 7.5 Der Th2-Inhibitor inhibiert die Expansion der T-Zellen. Wir erwarten eine geringere Frequenz der hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen gegenüber der Ethanol+NaCl- Gruppe.
- 7.6 Der Th2-Inhibitor inhibiert die Aktivierung von B-Zellen und verringert die Sekretion von hIgG und hIgE. Wir erwarten eine niedrigere Frequenz aktivierter B-Zellen, sowie geringere hIgG und hIgE Werte in der Ethanol + Th2-Inhibitor-Gruppe im Vergleich zur Ethanol + NaCl-Gruppe.
- 7.7. Der Th2-Inhibitor verringert die Frequenz der Th2 Zellen. Wir erwarten eine niedrigere Frequenz der hCD4⁺hCRTH2⁺ Zellen.

Material und Methoden

Rekrutierung der Spender

Die Rekrutierung der Spender erfolgte in der gastroenterologischen Sprechstunde von Herrn Prof. Dr. Max Schnurr, Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt, sowie Herrn Prof. Dr. Matthias Siebeck, Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt. Es wurde Blut von zwei diagnostizierten Colitis ulcerosa-Patienten verwandt. Als Selektionskriterium diente zum einen unterschiedliche Krankheitsverläufe der Spender - um die Einflüsse der verschiedenen Verlaufsformen in der Maus zu untersuchen - und zum anderen bei einem der Spender ein therapierefraktäres Verhalten gegenüber einem Glucocorticoid, um mit diesem im Mausmodell die Wirksamkeit eines Th2-Inhibitors zu testen. Ein Ausschlusskriterium für beiden Spender wäre eine Therapie mit Azathioprin. Die Blutprobenentnahme von 60ml Blut erfolgte gemäß dem Ethikvotum der Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 6.10.2010 und mit schriftlicher Einverständniserklärung der Spender.

Haltung der Mäuse

Die NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter OHB-Bedingungen (optimierter Hygienebereich) in individuell belüfteten Käfigen gehalten. Die Haltung erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung, Chirurgisches Klinikum Innenstadt, LMU München, welches gemäß der FELASA Richtlinien kontrolliert wird. Alle Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und gemäß den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes sowie der Vorgaben des Tierversuchsantrages mit der Nummer 55.2-1-54-2532-57-10 durchgeführt.

Isolierung hPBMCs und Rekonstitution der Mäuse

Zur Isolierung der hPBMCs aus dem Spenderblut wurden 40 ml Blut in S-Monovetten (10 ml 9NC Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet, welches von an Colitis ulcerosa erkrankten Patienten gewonnen wurde.

Das Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit Hanks Buffered Saline Solution (HBSS) (Hyclone Laboratories, Inc, Logan, USA) vermischt und auf Leucosep porous barrier 50 ml Röhrchen geladen (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland). Nachfolgend wurden sie bei 1600 rpm für 30 Minuten mit langsamer Steigung der Zentrifugalbeschleunigung und langsamer Reduktion zentrifugiert.

Es wurde die Interphase abgenommen und in ein 50 ml Falcon (BD Biosciences, Durham, USA) überführt. Zusätzlich wurde ein Aliquot entnommen und in Trypanblau (Sigma-Aldrich Co., St. Louise USA), im Verhältnis 1:1 resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (KARL ROTH GMBH&CO, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt.

Rekonstitution der Mäuse

Die Rekonstitution erfolgte mit 6 Wochen alten NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen. Zur Rekonstitution der NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäuse werden die isolierten Monozyten bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro 150 μ l in PBS resuspendiert und intravenös (i.v.) appliziert. Die Mäuse werden dazu in einem Restraîner fixiert und der Schwanz für 3 Minuten mit einer Infrarotlampe erwärmt, bis die Vena caudalis mediana prominent zum Vorschein tritt. Die Zellsuspension wird in 1 ml Insulin-BD Mikro-fine 0,33mm(29G)*12,7mm Spritzen (BD Medical, Le Pont de Claix Cedex, FRA) aufgezogen, und 150 μ l der Zellsuspension in die Vena caudalis mediana appliziert.

Behandlungsschema zur Kolitis Induktion

Am Tag der Rekonstitution erfolgt eine Gewichtsmessung der Mäuse.

Die Gruppen wurden, wie in Tabelle 3 dargestellt, eingeteilt:

In Experiment A: 3 Versuchsgruppe mit jeweils 4 NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen

In Experiment B: 4 Versuchsgruppen mit jeweils 4 NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen

Tabelle 3: Tierversuchs-Gruppengröße nach Spender und Behandlung

	Spender A	Spender B
Kontrollgruppe	4 Tiere	4 Tiere
Ethanol + NaCl	4 Tiere	4 Tiere
Ethanol + Prednisolon	4 Tiere	4 Tiere
Ethanol + Th2-Inhibitor	---	4 Tiere

Tabelle 4: Behandlungsschema zur Induktion der Colitis ulcerosa in rekonstituierten NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Eingriff																					
Rekonstitution	x																				
Sensitivierung								x							x				x		
Prednisolon/NaCl/Pitakora							x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x
Blutentnahme																					x
Inspektion Kot															x	x	x	x	x	x	x
Gewichtskontrolle	x							x		x		x			x	x	x	x	x	x	x
Inspektion Haut									x												
Scheren/Rasieren								x													

Eine Gruppe in beiden Experimenten verblieb nach der Rekonstitution unbehandelt und dient als Referenzgruppe. Diese Gruppe wird im folgenden Kontrollgruppe genannt. Die weiteren werden an Tag 8 mit 100 %igem Ethanol kutan sensitiviert. Hierfür wurde zuerst eine Fläche von ca. 3 x 2 cm geschoren und anschließend rasiert. Auf die so behandelte Fläche wurde dann 150 µl 100 % Ethanol mit einer Pipette gleichmäßig aufgetragen.

Die kutan sensitivierten Versuchstiere werden in Experiment A in 2 Gruppen aufgeteilt:

- 1) Ethanol + NaCl-Gruppe,
- 2) Ethanol + Prednisolon-Gruppe.

In Experiment B wurde eine 3. Gruppe als

- 3) Ethanol + Th2-Inhibitor-Gruppe definiert.

Die Gruppen werden entsprechend ihrer Gruppenzuteilung wie in Tabelle 4 aufgeführt mit 150 µl des entsprechenden Agens an Tag 7, 8 und 9 behandelt.

Der Ethanol + NaCl-Gruppe wurde isotonische Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) bei dieser und jeder folgenden Behandlung appliziert und sie wird fortan Ethanol + NaCl-Gruppe genannt. Die Ethanol + Prednisolon-Gruppe wurde mit Prednisolon in einer Konzentrationen von 0,4 mg/ml (MIBE GmbH, Brehna, Deutschland). Der Th2-Inhibitor ist ein antagonistisches Protein der IL-4 /IL-13 Signalkaskade, das von Prof. Dr. Thomas Mueller (Universität Würzburg) entwickelt und uns zur Verfügung gestellt wurde. Der Th2-Inhibitor wurde in einer Konzentration von 0,06 mg/ml appliziert.

An Tag 15 wurde 50 %iger Ethanol rektal appliziert und ab Tag 14 täglich bis zum Versuchsende entweder 150 µl NaCl, 150 µl Prednisolon oder 150 µl Th2-Inhibitor (je nach Gruppe) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Vom Behandlungsschema ausgenommen, war wie oben dargestellt, die Referenzgruppe.

Die rektale Applikation an Tag 15 erfolgte unter Isofluraninhalationsanästhesie mit 150 µl 50 %igen Ethanols durch einen Katzen-Katheter mit 1mm Außendurchmesser (Henry Schein, Hamburg).

Die Anflutungsphase der Isofluraninhalationsanästhesie, bis zum Aussetzen des Zwischenzehenreflexes, erfolgte bei einer Sauerstoffdurchflussrate von 2 Liter/min und einem Isoflurangehalt von 4 %. Die Erhaltungsnarkose erfolgte bei einem Sauerstoffdurchfluss von 2 Liter/min und einem Isoflurangehalt von 1,5-2 % je nach Zustand des Tieres.

Nach der Applikation des Ethanols wurde der Katheter vorsichtig entfernt und das kaudale Ende der Maus für ca. 10 s erhöht lokalisiert um ein Entweichen des Ethanols zu verhindern.

Gewichtsmessungen fanden an Tag 1, 8, 10 und 12 statt. Ab Tag 15 wurde eine tägliche Gewichtsmessung durchgeführt.

Klinischer Aktivitätsscore

Der klinische Aktivitätsscore der Versuchstiere wurde durch tägliche Adspektion ermittelt und von jeder Maus gemäß Tabelle 5 einzeln erhoben. Es können maximal 24 Punkte erreicht werden jedoch werden Mäuse ab einem klinischen Score von 15 oder größer aus dem Versuch genommen und euthanasiert.

Weitere Abbruchkriterien wurden wie folgt definiert:

- Gewichtsverlust von über 15 % anhaltend über die Dauer von 2 Tagen
- Stark reduzierter Allgemeinzustand des Tieres (Apathie, Selbstisolation)
- Automutilation
- Bauchhöhlenerguss
- Jegliche Abstoßungsreaktion (graft-versus-host disease), erkennbar durch Ikterus, Gastroenteritis, reduziertes Allgemeinbefinden und struppiges Fell, tritt meist nach 100 Tagen auf

Tabelle 5: Kriterien zur Feststellung des klinischen Aktivitätsscore.

Beobachtung		Punkte
Status Körpergewicht	Kein KGW-Verlust	0
	Gewichtsverlust 0-5%	1
	Gewichtsverlust 5-10%	2
	Gewichtsverlust 10-15%	3
	Gewichtsverlust 15%	4
Kotkonsistenz	Geformert Kot	0
	Breiiger Kot	2
	Flüssiger Kot	4
Rektale Blutung	Hämokult negativ	0
	Hämokult positiv	4
Verhalten	lebhaft/normal	0
	ruhig	1
	apathisch	3
	Struppiges Fell	1
Tod		5

An Tag 21 wurden die Mäuse in eine Injektionsnarkose, mit 300 µl eines Ketamin / Xylazingemisches gelöst in isotonischer Kochsalzlösung, bestehend aus 6 mg/kg KGW Xylazin (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) sowie 90 mg/kg KGW Ketamin (Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) gelegt.

Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurde das Versuchstier durch eine retrobulbäre Blutentnahme entblutet und durch eine zervikale Dislokation getötet.

Probenanalyse des Tierversuches

Am letzten Versuchstag wurde Blut, Milz und Darm entnommen und anhand des in Abb. 2 gezeigten Schemas analysiert.

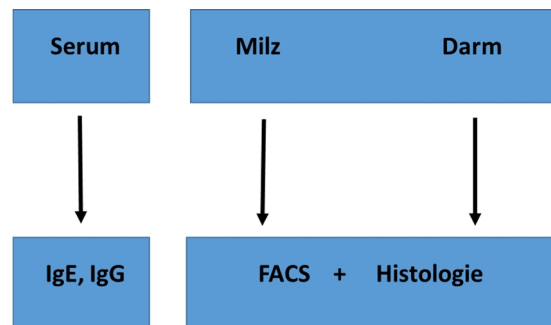


Abb. 2: Analyseschema der Proben des Tierversuches

Ziel der Analyse war, den Einfluss des immunologischen Hintergrunds der Spender auf den Reiz mit Ethanol und auf die Behandlung mit Prednisolon zu untersuchen.

Das Kolon wurde dazu mit PBS gespült, und ein ca. 1 cm langes Stück des Kolons in Tissue-Tec (Sakura Finetec Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und bei -20°C in Methylbutan per Kryokonservierung fixiert.

Der restliche Teil des Kolons wurde manuell zerkleinert und mit Liberase TL (Roche, Mannheim, Deutschland) verdaut. Nach dem Verdau wurden die Zellen zur Durchflusszytometrie gefärbt.

Aus der Milz wurde eine Einzelzellsuspension erstellt indem sie manuell homogenisiert wurde und die Zellen mit PBS (Life Technologies Corporation, Paisley, UK) herausgewaschen wurden.

Die so entstandenen Suspensionen von Kolon und Milz wurden per Durchflusszytometrie, getrennt voneinander, analysiert.

Histologie

Die histologische Auswertung erfolgte mit einer HE (Hämatoxylin/Eosin) Färbung. Um die HE Färbung vorzunehmen ist zuerst eine Beschichtung der Objektträger notwendig, um eine bessere Haftung der Schnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, der das Anfertigen der Gefrierschnitte folgt. Nach der Fixation der Gewebeschnitte mit anschließender Färbung wurden exemplarische mikroskopische Bilder der histologischen Schnitte erstellt.

Beschichten von Objektträgern

Mattrand-Objektträger (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) werden 5 Minuten in Aceton (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) entfettet, danach getrocknet und 20 Minuten in einer Poly-L-Lysin Lösung (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei einer Konzentration von 25 µg/ml Poly-L-Lysin beschichtet. Im Anschluss werden die beschichteten Objektträger getrocknet und entweder zur Lagerung in den Kühlschrank gestellt oder bei -20°C eingefroren.

Anfertigen der Gewebeschnitte

Das Anfertigen der Gewebeschnitte erfolgt im Microm HM 500 O Cryostat (Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland). Die Innentemperatur des Cryostaten sowie des Schnittmessers betrug -20°C. Die Gewebeschnitte wurde mit einer Schnittdicke von 10 Mikrometer angefertigt. Die geschnittenen Darmabschnitte wurden auf die beschichteten Mattrand-Objektträger übertragen und bis zur Färbung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

HE Färbung

Zuerst erfolgte eine Rehydrierung in absteigender Ethanolkonzentration. Dafür wurden die Objektträger 2-3-mal in 100 % Ethanol (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) getaucht, darauffolgend 2-3-mal in 96 % Ethanol (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und schließlich 2-3-mal in 70 % Ethanol (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

Die Schnitte wurden anschließend in destilliertem Wasser durch 2-3 maliges eingetaucht um das Ethanol vollständig zu entfernen und danach in saurer Hämalaunlösung (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) nach Meyer für 7 Minuten inkubiert. Die Entfernung des überschüssigen Hämalauns erfolgte durch dreimaliges Eintauchen in 0,75 % HCl in 70 %iger Ethanol-Lösung (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die Gewebeschnitte wurden anschließend in zwei aufeinanderfolgenden Gefäßen mit handwarmen H₂O durch jeweils dreimaliges Eintauchen gebläut. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 1 Minute in 2 %iger Eosinlösung (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Überschüssiges Eosin wurde durch dreimaliges Eintauchen in Leitungswasser entfernt. Darauf erfolgte eine Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend mit 2-3 maligem Eintauchen in 70 %igem Ethanol zur Differenzierung von Eosin, anschließend durch 2-3 maliges Eintauchen in 96 % Ethanol und schließlich durch 2-3 maliges Eintauchen in 100 % Ethanol. Als Intermedium dient schließlich Xylol das in 3 Küvetten aufgeteilt ist in welches die Gewebeschnitte jeweils 2-3 Mal eingetaucht werden.

Die Gewebeschnitte wurden zuletzt mit Hilfe von Malinol (Carlroth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) Einbettmedium eingebettet.

Bestimmung des humanen IgE und IgG-Gehaltes im Serum

Der hIgE und hIgG-Gehalt des Serums wurde durch das Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München, Campus Innenstadt, der LMU München mittels Immunturbidimetrie bestimmt.

Durchflusszytometrie (FACS/fluorescence-activated cell sorting):

Die durchflusszytometrische Auswertung erfolgte mit einem FACS Canto 1 Zytometer und der FACS Diva Software der Firma BD (Heidelberg, Deutschland).

Die Färbung der Zellen wurde gemäß der Standardvorgehensweise mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ beziehungsweise $5 \cdot 10^6$ Zellen auf $100 \mu\text{l}$ durchgeführt.

In Tabelle 6 werden die Antikörper sowie ihre Farbstoffe aufgeführt.

Tabelle 6: Zusammenfassung der gemessenen zellulären Marker mit ihrer Funktion. T= T-Zellen, B= B-Zellen, Ma = Makrophagen, Gr = Granulozyten, NK = Natürliche Killerzellen, Pl = Thrombozyten, EPC = Epithelzellen, EDC= Endothelzellen, ER = Erythrozyten, DC = Dendritische Zellen, SC = Stammzellen

Antikörper	Exprimiert auf	Funktion
CD4 APC	T, Ma, Gr,	T-Zell Aktivierung in der frühen Phase
CD4 Cy	T, Ma, Gr,	T-Zell Aktivierung in der frühen Phase
CD23 FITC	T, B, NK, Ma, Gr	Leukozyten-Endothel-Interaktionen und T-Zell vermittelte Zytotoxizität
CD23 APC	Ma, Gr	Vermittelt die Immunantwort auf bakterielle Lipopolysaccharide (LPS)
CD44 PE	Ma	Transendotheliale Migration von Neutrophilen, Immunantwort auf Aktivierung
CD8 Cy	T, B	Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen
CD11c PECy7	T, B, DC, Ma, Gr, Pl, EC	B-Zell Wachstum und Aktivierung, essentielle Rolle bei der IgE Produktion und in der Differenzierung von B-Zellen
CD27 PE Cy7	T, B, DC, Ma, Gr, Pl, EC	B-Zell Wachstum und Aktivierung, essentielle Rolle bei der IgE Produktion und in der Differenzierung von B-Zellen
CD11b APC Cy7	T, B, NK, Ma	Rezeptor für Interleukin-2
CD19 Cy	T, B, DC, Ma, SC, NK	Zelladhäsion und Signaltransduktion
CD62L FITC	T, B, NK, Ma, Gr, ER, EPC, EDC	Zelladhäsion und Migration
CD94 PE	T, SC, Ma	Rezeptor für IL-7 und Thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Dieser Rezeptor ist wichtig für die somatische Rekombination
CD56 FITC	T	Vermittelt B Zell Proliferation, IgE Production, und ist in Oberflächenantigenwechsel von Immunoglobulinen involviert.
CD294 (CRTH2) PE	T	Exprimiert auf aktivierten T-Zellen. Hat vermutlich wichtige Bedeutung für Th2-Zellen
CD3 APC Cy7	intrazellulär	Effektor-Caspasen involviert in die Apoptose
CD3 PE Cy7	intrazellulär	Effektor-Caspasen involviert in die Apoptose
NKDG2 Cy	NK	NK Zellrezeptor
Anti mouse CD45 PeCy7	T, B, DC, SC, Ma, NK, Gr	Regulator der T- und B-Zell Antigen Signalkaskade, Regulator von Zellwachstum und Zelldifferenzierung (spezifisch für murine Rezeptoren)
IgD APC Cy7	B	B-Zellrezeptor (naive B-Zellen)
Anti human CD45 APC Cy7	B	Regulator der T- und B-Zell Antigen Signalkaskade, Regulator von Zellwachstum und Zelldifferenzierung (spezifisch für humane Rezeptoren)

Durchflusszytometrie-Parameter und Gating Strategie:

Die Gesamtlmphozytenpopulation wurde mittels CD45 Marker identifiziert und durch humane CD45 Marker und murine CD45 Marker in murine und humane Lymphozytenpopulation aufgeteilt.

Anhand des CD19 Markers, sowie des IgD Markers wurden innerhalb der Lymphozyten die B-Zellen identifiziert und anschliessend zwischen naiven und memory B-Zellen mittels CD23-Marker und CD27-Marker unterschieden, wobei $CD23^+/CD27^-$ Zellen naive B-Zellen darstellten, während $CD23^-/CD27^+$ memory B-Zellen widerspiegelten.

Die T Zell Populationen innerhalb der Gesamt-Lymphozytenpopulation wurden mittels CD4 und CD8 Marker unterschieden, wobei $CD4^+/CD8^-$ Th1 und Th2 Zellen repräsentierten und $CD4^-/CD8^+$ cytotoxische T-Zellen darstellen. Jede der T Zellpopulationen wurde mittels CD62L und CD44 in naive ($CD62L^+/CD44^-$) und aktivierte Zellen ($CD62L^-/CD44^+$) unterschieden. Die Frequenz der Th2-Zellen innerhalb der $CD4^+$ Population wurde mittels CCR2 Marker untersucht.

Weiter wurden die Frequenz von NK und NKT-Zellen bestimmt. Für die Unterscheidung zwischen NK und NKT-Zellen setzte man CD3, CD56, CD94 und NKDG2 ein. NK-Zellen sind $CD3^-/CD56^+/CD127^+$ und NKDG2⁺.

Die myeloiden Zellpopulationen wurden ebenfalls anhand der FACS-Analyse untersucht. Macrophagen und Dendritische Zellen werden mittels CD11b und CD11c getrennt, wobei Macrophagen $CD11b^+$ sind, während Dendritische Zellen $CD11c^+$ sind.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der freien Statistik-Software R. (www.r-project.org). Für die statistische Analyse wurde die Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom Tukey-Test als multipler Vergleichstest verwendet [42].

Ergebnisse

Ergebnisse der Spenderauswertung

1.1. Charakterisierung der Spender um den Einfluss des immunologischen Spenderprofils auf das humanisierte Mausmodell in NOD-scid IL2R γ -chain^{null}-Mäusen zu untersuchen

Es wurde zunächst eine Erhebung der wichtigsten Patientendaten durchgeführt (Tabelle 7). Beide Patienten unterscheiden sich deutlich in Verlauf der Erkrankung und Ansprechen auf die Therapie.

Spender A leidet unter einer leichten, chronisch rezidivierenden Form der Colitis ulcerosa, wohingegen Spender B seit der Erstdiagnose vor 4 Jahren chronisch kontinuierlich erkrankt ist und nur eingeschränkt auf die Kombinationspräparate anspricht. Da Spender B auf die verordnete Medikation nicht anspricht und das immunologische Profil die Wirksamkeit eines Th2-Inhibitors vermuten ließ, wurde in diesem Mausmodell, zusätzlich zur ursprünglichen Validierung mit Prednisolon, auch ein Th2-Inhibitor getestet.

Tabelle 7: Klinische Daten der Spender.

Spender	Diagnose	CAS-Score	Alter	Bauchkrämpfe	Durchfall	Medikamente	Verlauf
A	UC	3	47	ja	ja	Mesalazin	Chron. rezidivierend
B	UC	6	19	ja	ja	Mesalazin, Cortison, Adalimumab	Chron. kontinuierlich

Durchflusszytometrische Analyse des humanen peripheren Blutes

Das Spenderprofil wurde anhand der Frequenz der aktivierten B-Zellen, CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁺ CRTH2⁺ Zellen bestimmt.

Beide Spender unterscheiden sich hinsichtlich ihres immunologischen Profils, wie in Tabelle 8 gezeigt, deutlich. Die Auswertung in Tabelle 8 erfolgte als Prozentsatz der Gesamt-Lymphozytenpopulation. Die Darstellung in Anhang 1 und Anhang 2 erfolgte aus der relativen Lymphozytenpopulation. Die Prozentsätze der Subpopulationen der Lymphozyten beziehen sich auf die übergeordnete Lymphozytenpopulation.

Spender A hat eine geringere Frequenz an CD27⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- und CRTH2⁺- Zellen, wohingegen Patient B eine höhere Frequenz aufweist. Die erhöhte Frequenz der Th2 Zellen sprach, neben dem therapierefraktärem Verhalten gegenüber Glucocorticoiden, ebenfalls für die Testung des Th2-Inhibitors im Mausmodell.

Tabelle 8. Durchflusszytometrische Zusammenfassung des immunologischen Spenderhintergrundes.

Spender	CD27+ [%]	CD4+ [%]	CD8+ [%]	CRTH2+ [%]
A	0,90	6,54	7,91	0,01
B	1,63	21,31	23,43	5,26

Ergebnisse des Tierversuchs

Der Einfluss des immunologischen Hintergrunds der Spender und der Behandlung auf den Rekonstitutionsgrad

Da in diesen Tiermodellen die pathologischen Manifestationen durch immunologische Zellen hervorgerufen werden, ist eine ausreichende Rekonstitution mit humanen Immunzellen von großer Bedeutung. Zur Bestimmung des Rekonstitutionsgrads wurden humane und murine CD45 positive Zellen aus der Milz isoliert und einer durchflusszytometrischen Analyse unterworfen.

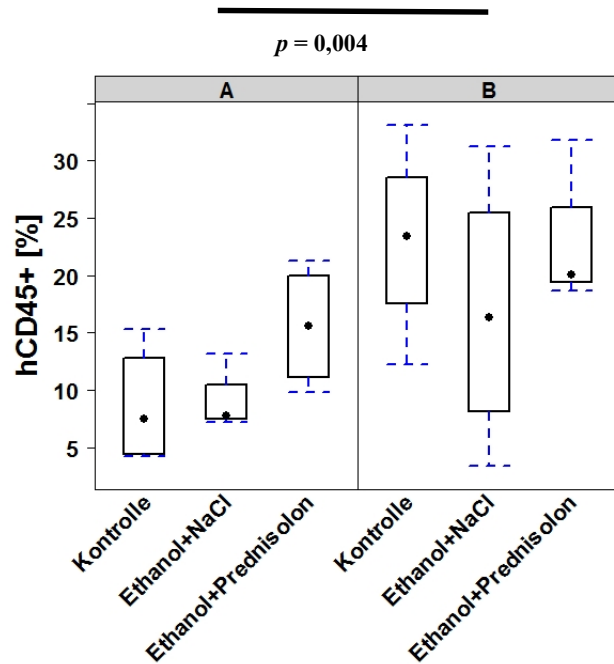


Abb. 3: Boxplot Graphik - Anteil humaner CD45 Zellen in der Gesamtlymphozyten Population der Maus in Abhängigkeit von Spender (A und B), sowie Behandlung.

Wie in Abb. 3 und Anhang 3 gezeigt war der Rekonstitutionsgrad der Versuchstiere bei Spender A in allen Gruppen niedriger als in den selber Versuchsgruppen von Spender B. In dem Experiment mit dem Spender A wurde ein durchschnittlicher Rekonstitutionsgrad von $10,26 \pm 4,64$ % und bei Spender B von $21,11 \pm 9,39$ % gemessen. Der Unterschied zwischen dem Rekonstitutionsgrad der Spender war statistisch signifikant mit einem p -Wert von 0,004. Durch die Behandlung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Rekonstitution. Eine Maus aus der Ethanol + Prednisolon-Gruppe von Spender B wurde wegen zu geringen Rekonstitutionsgrads aus der Analyse ausgeschlossen.

Der Einfluss des immunologischen Hintergrunds der Spender und der Behandlung auf den klinischen Aktivitätsscore

Der klinische Aktivitätsscore wurde anhand festgelegter Parameter (Tabelle 5) erhoben und für jedes Tier individuell bestimmt.

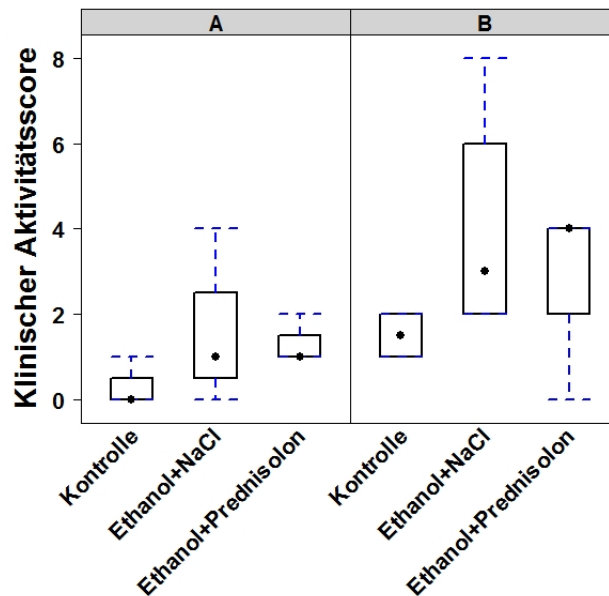


Abb. 4: Boxplot Graphik - Klinischer Aktivitätsscore in Abhängigkeit von Behandlung und Spender (A und B).

Bei den Mäusen der unbehandelten Gruppe wurde kein bzw. ein geringer klinischer Aktivitätsscore beobachtet (Abb. 4). Die Versuchstiere, die mit PBMCs aus Spender B rekonstituiert waren, zeigten einen höheren klinischen Aktivitätsscore als die Versuchstiere, die mit PBMCs von Spender A rekonstituiert waren. Versuchstiere, die einem Reiz durch Ethanol exponiert waren, zeigten nur eine geringfügige Veränderung des CAS, wenn man den maximal erreichbaren Wert von 24 als Bewertung zugrunde legt. In beiden Spendergruppen konnte jedoch eine leichte Steigerung des klinischen Aktivitätsscores der mit Ethanol behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe gesehen werden. Der Median des klinischen Aktivitätsscores der Kontrollgruppen betrug $0 \pm 0,5$ und $1,5 \pm 0,57$. In den Ethanol behandelten Gruppen stieg der Aktivitätsscore der Ethanol+NaCl Subgruppen auf $1 \pm 2,08$ und $3 \pm 2,82$. In der Ethanol+Prednisolon Gruppe wurden Aktivitätsscores von $1 \pm 0,5$ und $4 \pm 2,30$ gemessen. Die gemessenen Veränderungen des klinischen Aktivitätsscores sind nicht signifikant. Bei den rekonstituierten Mäusen, die Patient A als Spenderhintergrund aufweisen, ist im Median nur ein geringer Unterschied zwischen der mit NaCl und der mit Prednisolon behandelten Gruppe

zu sehen. Bei den mit Spender B PBMCs rekonstituierten Mäusen schien Prednisolon keinen weiteren Einfluss auf das klinische Bild zu haben.

Der Einfluss des immunologischen Hintergrundes des Spenders und der Behandlung auf die Sekretion von humanen Immunglobulinen IgE und IgG

In beiden Experimenten wurde jeweils die Konzentration von hIgG sowie hIgE im Serum der Mäuse bestimmt und anschließend zwischen den Spendern sowie den Behandlungskohorten verglichen.

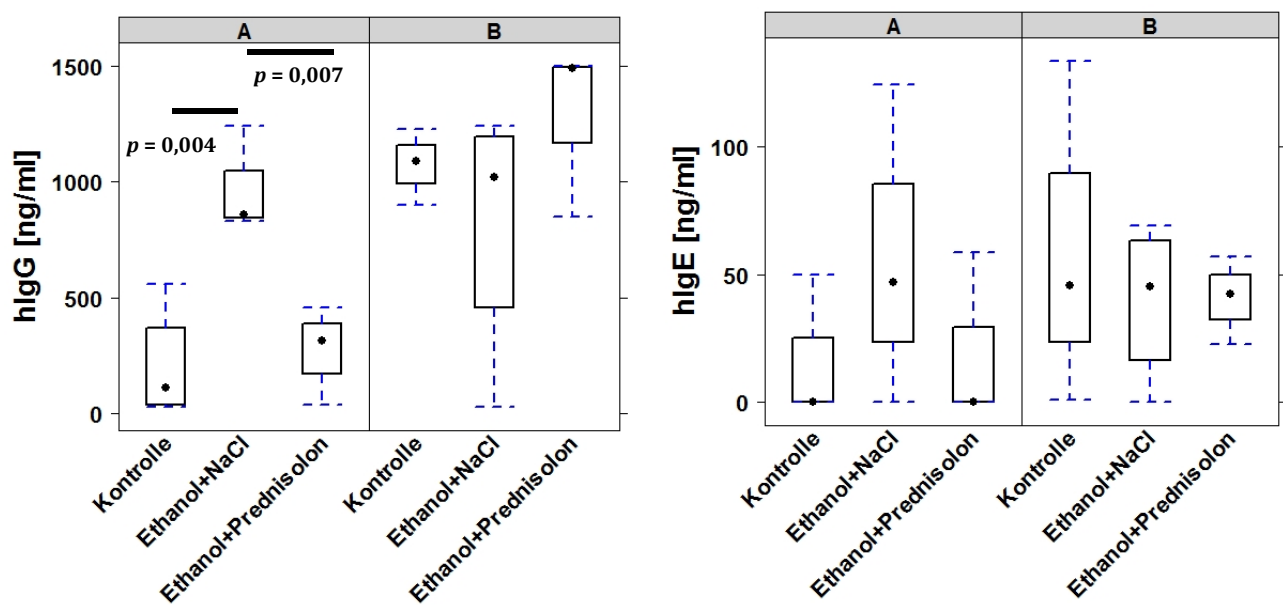


Abb. 5: Boxplot Graphik - Sekretion von hIgG (links) und hIgE (rechts) in Abhängigkeit von Behandlung und Spender (A und B).

Veränderung des hIgG-Wertes

Wie in Abbildung 5 dargestellt zeigte sich in den Kontrollgruppen ein Unterschied zwischen den beiden Experimenten. In Experiment B war der Median des hIgG Wert höher als in Experiment A. Durch den Reiz mit Ethanol wurde in den Mäusen des Experiments A die Sekretion von hIgG von $115,00 \pm 245,83$ ng/ml in der Kontrollgruppe auf $860 \pm 228,54$ ng/ml in der Ethanol+NaCl Gruppe induziert. Die Ethanol + Prednisolon-Gruppe zeigte einen Abfall des hIgG-Wertes auf $315,00 \pm 175,57$ ng/ml. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Ethanol + NaCl-Gruppe war mit einem p-Wert von 0,004, genauso wie der Unterschied zwischen der Ethanol+NaCl und der Ethanol+Prednisolon Gruppe mit einem p-Wert von 0,007 statistisch signifikant.

In der Ethanol+NaCl Gruppe des Experimentes B konnte kein weiterer Anstieg beobachtet werden. Alle Gruppen zeigen hIgG Werte von $1090,00 \pm 165,63$ ng/ml bis $1490,00 \pm 372,42$ ng/ml. Die Versuchstiere reagierten nicht mit einem Abfall des hIgG Wertes durch die Behandlung mit Prednisolon.

Veränderung des hIgE-Wertes

Die Ergebnisse der hIgE Sekretion folgten dem Muster der hIgG Sekretion. Die Tiere des Experimentes A zeigten nach Reizexposition einen Anstieg der hIgE Konzentration im Serum auf $46,79 \pm 62,77$ ng/ml. Die Behandlung mit Prednisolon führte zu einem Abfall des hIgE Wertes auf das Niveau der Kontrollgruppe ($0,00 \pm 29,38$ ng/ml und $0,00 \pm 24,99$ ng/ml).

In Experiment B wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Hier liegt schon in der Kontrollgruppe eine hohe Konzentration an hIgE ($45,60 \pm 62,75$ ng/ml) vor. Durch die Applikation von Ethanol und die Behandlung mit Prednisolon wird die Sekretion nicht beeinflusst. Die hIgE Konzentration blieb bei $45,12 \pm 30,61$ ng/ml und $42,24 \pm 17,33$ ng/ml in der Ethanol + NaCl-Gruppe bzw. der Ethanol + Prednisolon-Gruppe.

Einfluss der Behandlung und des Spenderhintergrundes auf B-Zellen und aktivierte B-Zellen.

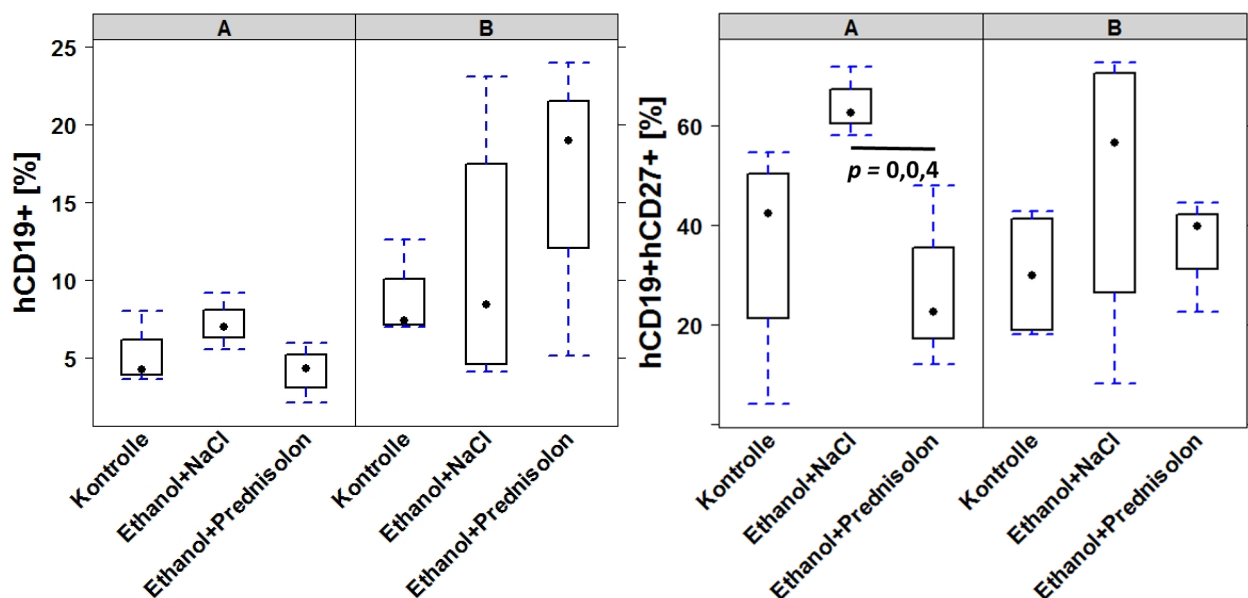


Abb. 6: Boxplot Graphik - Frequenz humaner B-Zellen (hCD19+, links) und aktivierter B-Zellen (hCD19+hCD27+, rechts) in Abhängigkeit von Spender (A und B), sowie Behandlung.

Um zu testen, ob die gemessenen hIgG / hIgE Werte sich in den humanen B-Zellen widerspiegeln, wurden die Lymphozyten aus der Milz isoliert und einer durchflusszytometrischen Analyse unterworfen.

Zuerst wurde die Frequenz aller B-Zellen anhand des hCD19 Markers bestimmt. In beiden Experimenten ist die Frequenz geringer als die Frequenz der hCD19⁺ Zellen, die im peripheren Blut der Spender zum Zeitpunkt der Rekonstitution gemessen wurde.

Die Frequenz der B-Zellen waren, wie in Abb. 6 und Anhang 4 gezeigt, in Experiment B erhöht im Vergleich zu Experiment A. In Experiment A wurde eine Frequenz von hCD19⁺ Zellen von $4,23 \pm 2,02$ % und in Experiment B von $7,38 \pm 2,68$ % gemessen.

Durch den Reiz mit Ethanol kam es in beiden Experimenten zu einer Erhöhung der Frequenz der B-Zellen. In Experiment A war es ein Anstieg von $4,23 \pm 2,02$ % auf $7,02 \pm 1,825$ %, während es in Experiment B ein Anstieg von $7,38 \pm 2,68$ % auf $8,45 \pm 8,74$ % war.

Wie auch schon bei den hIgE und hIgG-Werten (Abb.8) gesehen werden konnte, wirkte sich die Prednisolon-Behandlung in Experiment A auf die Frequenz der hCD19⁺ Zellen aus und führte zu einem Abfall im Vergleich zur Ethanol + NaCl-Gruppe auf einen Wert von $4,30 \pm 1,59$ %. In Experiment B konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, und es wurde sogar eine deutliche Proliferation der B-Zellpopulation in der Ethanol + Prednisolon-Gruppe auf $19,00 \pm 9,78$ % beobachtet. Dieser Effekt schlug sich auch in der erhöhten Sekretion von hIgG in dieser Gruppe nieder (Abb. 10).

Die aktivierten B-Zellen wurden mit dem Marker hCD27 identifiziert. In beiden Experimenten zeigte sich eine deutliche Erhöhung in der Frequenz durch den Reiz mit Ethanol. In Experiment A stieg der Median von $42,3 \pm 22,14$ % auf $62,6 \pm 7,03$ % und In Experiment B von $29,85 \pm 13,01$ % auf $56,5 \pm 29,58$ % gegenüber der Kontrollgruppe an. Die Applikation von Prednisolon führte in beiden Experimenten zu einem Absinken der Frequenz der hCD19⁺ hCD27⁺ Zellen auf $22,50 \pm 15,29$ % in Experiment A und auf $39,80 \pm 11,62$ % in Experiment B. Der Unterschied zwischen den Ethanol+NaCl und Ethanol+Prednisolon -behandelten Tieren in Experiment A war mit einem p-Wert von 0,04 statistisch signifikant.

Einfluss der Behandlung und des Spenderhintergrunds auf T-Zellen und Subtypen der T-Zellen

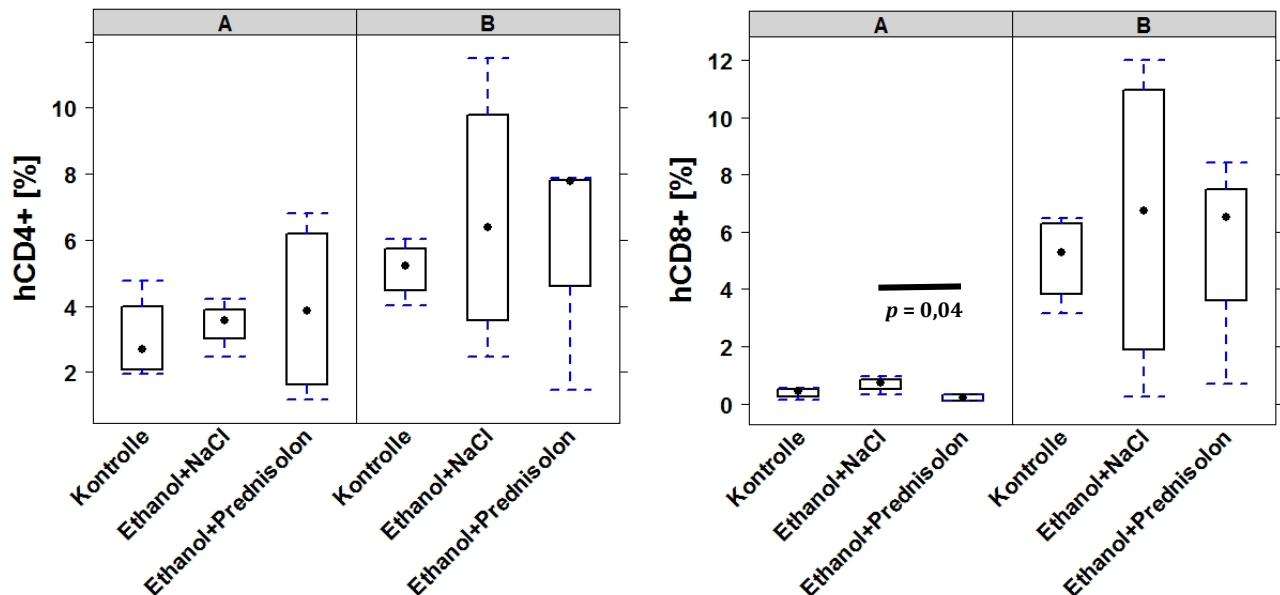


Abb. 7: Boxplot Graphik - Frequenz humaner T-Zellen (hCD4⁺, links / hCD8⁺, rechts) in Abhängigkeit von Spender (A und B), sowie Behandlung.

hCD4⁺ Zellen

Die Frequenz der hCD4⁺ Population (Abb. 7 und Anhang 5) war in Experiment A mit $2,69 \pm 1,28$ % deutlich niedriger als in Experiment B mit $5,21 \pm 0,85$ %. Dies entsprach den Verhältnissen, die im peripheren Blut der Patienten gemessen wurde. Auch hier war die Frequenz der hCD4⁺ Zellen des Spenders A geringer als die des Spenders B. Die Ethanol + NaCl-Gruppe und die Ethanol + Prednisolon-Gruppe zeigten einen geringfügigen Anstieg bzw. Abfall. Die Frequenz war mit den Werten $3,58 \pm 0,89$ % und $3,85 \pm 2,70$ % etwa gleich hoch. In Experiment B stieg die Frequenz von $5,21 \pm 0,85$ % eine Frequenz von $6,37 \pm 3,95$ in der Ethanol + NaCl-Gruppe und stieg in der Ethanol + Prednisolon-Gruppe abermals auf einen Wert von $7,76 \pm 3,67$ % an.

hCD8⁺ Zellen

Wie schon bei der hCD4⁺ Population beobachtet, war die Frequenz der hCD8⁺ Population in Experiment A mit $0,45 \pm 0,17$ % deutlich niedriger als in Experiment B mit $5,29 \pm 1,52$ %.

In beiden Experimenten konnte ein Anstieg der hCD8⁺ T Zell Population mit der Applikation von Ethanol beobachtet werden. Die hCD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in Experiment A zeigten

eine Erhöhung in der Ethanol+NaCl -Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe von $0,45 \pm 0,17$ % auf $0,72 \pm 0,32$ %. Durch Prednisolon sank der Wert auf $0,2 \pm 0,12$ %. Dieser Wert war niedriger als der Kontrollwert. Dieser Unterschied zwischen Ethanol + NaCl und Ethanol + Prednisolon war statistisch signifikant (p -Wert von 0,04). Auch in Experiment B wurde in der Ethanol + NaCl Gruppe ein Anstieg von $5,29 \pm 1,52$ % gemessen. Wie auch schon bei der Frequenz der B-Zellen beobachtet, sank dieser Wert jedoch nicht durch die Gabe von Prednisolon, sondern blieb konstant bei $6,53 \pm 4,01$ %.

hCD44/hCD62L-Verhältnis von hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen

Um zu testen, ob durch den Reiz die Differenzierung und Expansion von naiven T-Zellen zu aktivierten T-Zellen ausgelöst wird, wurden zwei weitere Marker zur Charakterisierung verwendet. hCD44 ist der Marker für die Aktivierung der hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen, hCD62L der Marker für die naiven hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen. Um die Aktivierung zu bestimmen, wurde das Verhältnis beider Populationen bestimmt. Durch den Reiz mit Ethanol oder die Behandlung mit Prednisolon konnte in beiden Experimenten kein Einfluss auf die Aktivierung bei der hCD4⁺ Population beobachtet werden (Abb. 8, Anhang 6 und 7). So liegt der Wert in Experiment A in der Kontrollgruppe bei $(1,77 \pm 0,46):1$, in der Ethanol + NaCl-Gruppe bei $(1,54 \pm 0,82):1$ und in der Ethanol + Prednisolon-Gruppe bei $(1,83 \pm 0,64):1$. In Experiment B liegt der Wert in der Kontrollgruppe bei $(1,47 \pm 1,29):1$, in der Ethanol + NaCl-Gruppe bei $(1,53 \pm 1,01):1$. Bemerkenswert ist, dass die Ethanol + Prednisolon Gruppe des Experiments B wie bei der Frequenz der B-Zellen, hCD4⁺ Zellen und hCD8⁺ Zellen nicht durch eine Inhibition gekennzeichnet ist, sondern durch einen Anstieg der Werte. Hier liegt das Verhältnis zwischen aktivierten hCD4⁺ Zellen zu naiven bei $(3,53 \pm 2,61):1$.

Bei der hCD8⁺ Population sieht man bei Spender A ein Abfallen des Verhältnisses vom Kontrollgruppenwert von $1,30 \pm 0,43$ auf einen Wert in der Ethanol+NaCl Gruppe von $(0,84 \pm 0,31):1$. In der Ethanol + Prednisolon-Gruppe steigen die Werte wieder auf ein Verhältnis von $(1,54 \pm 0,82):1$ an.

In Experiment B bleiben die Verhältnisse in der Kontrollgruppe und Ethanol + NaCl-Gruppe mit $(1,35 \pm 0,67):1$ und $(1,15 \pm 0,57):1$ relativ konstant. In der Ethanol + Prednisolon-Gruppe erfolgt ein deutlicher Anstieg des Verhältnisses auf $(2,89 \pm 0,25):1$.

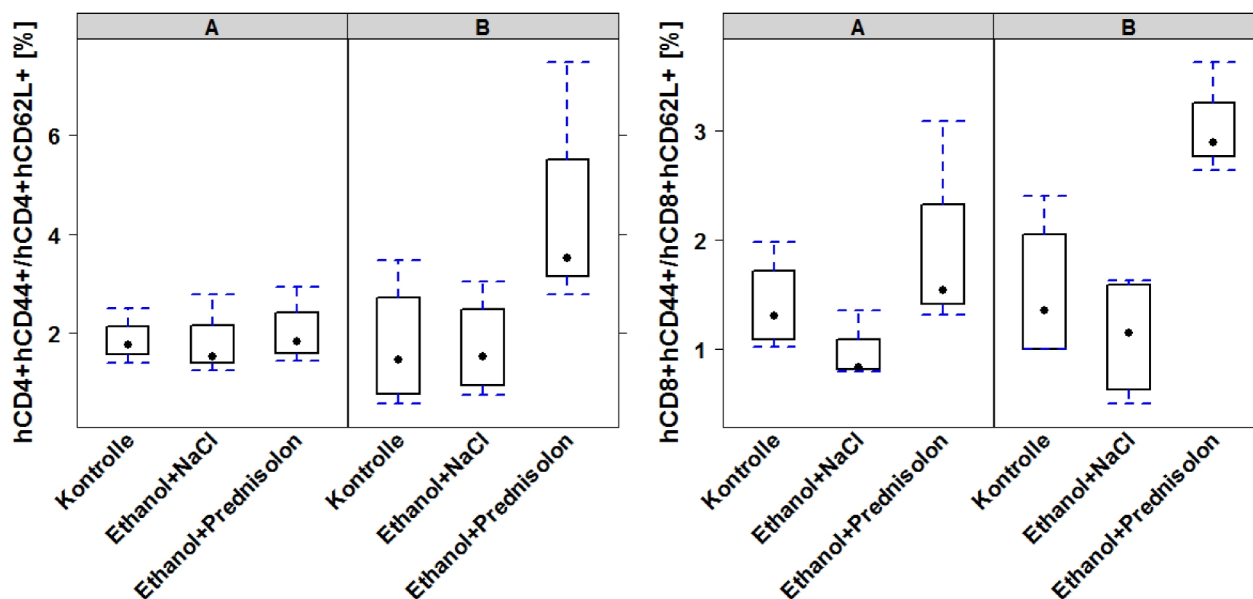


Abb. 8: Boxplot Graphik - Verhältnis von aktivierten zu naiven hCD4+ und hCD8+ Zellen in Abhängigkeit von Spender und Behandlung.

Einfluss der Behandlung und des Spenderhintergrunds auf die Kolonlänge

Die Verkürzung des Kolons wurde in vergangenen Studien als ein Maß für den Schweregrad der Erkrankung beschrieben [30, 36].

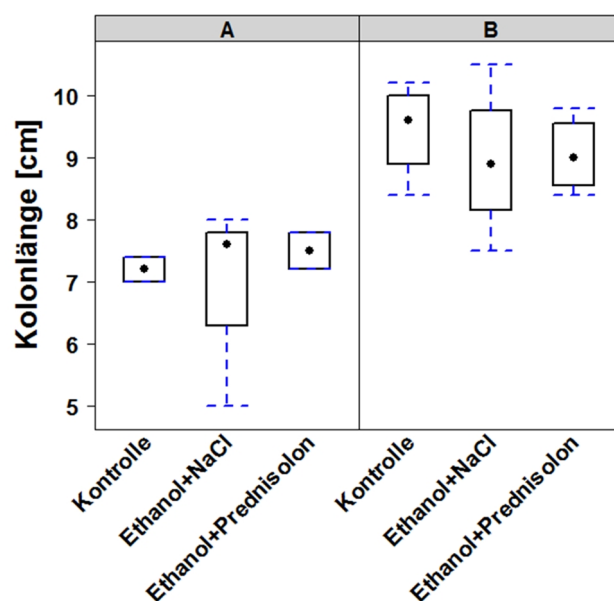
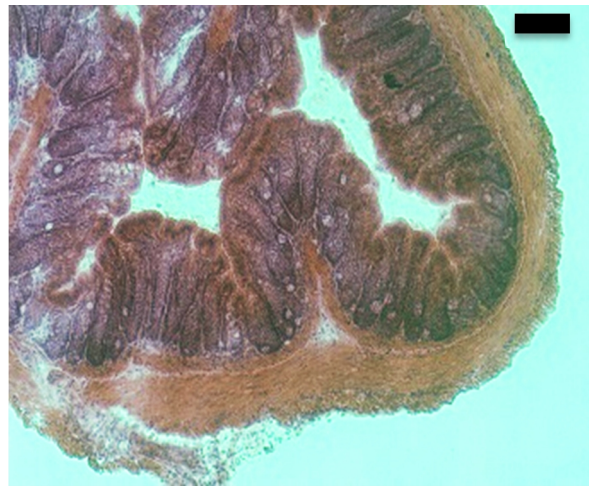


Abb. 9: Boxplot Graphik - Kolonlänge in Abhängigkeit von Spender (A und B), sowie Behandlung.

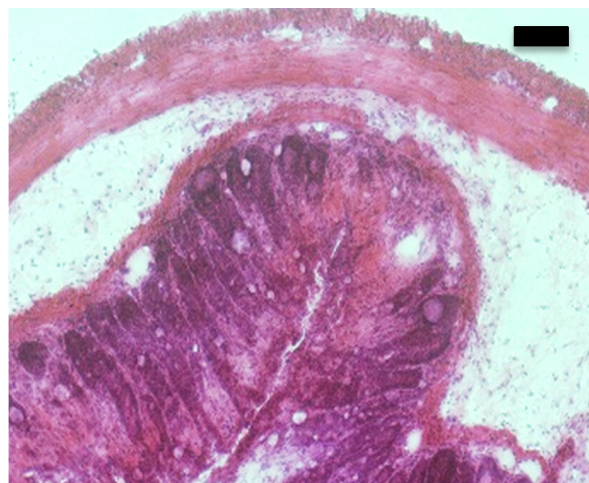
Wie in Abb. 9 veranschaulicht, zeigten die mit den PBMCs von Spender B rekonstituierten Tiere generell einen höheren Ausgangswert in der Länge des Kolons ($9,6 \pm 0,77$ cm) als die von Spender A rekonstituierten Versuchstiere ($7,2 \pm 0,28$ cm). Die Verkürzung des Darmes ist wie in vorherigen Arbeiten beschrieben geringfügig [30]. Die Verkürzung des Kolons nach Reizexposition, die sich bei Spender B zeigte (von $9,6 \pm 0,77$ cm auf $8,9 \pm 1,23$ cm), konnte bei Spender A nicht gezeigt werden (von $7,2 \pm 0,28$ cm auf $7,6 \pm 1,63$ cm). Die Ethanol + Prednisolon-Gruppe zeigte in Experiment A mit $7,5 \pm 0,42$ cm, genau wie in Experiment B mit $9 \pm 0,62$ cm keinen Effekt auf die Länge des Kolons.

Einfluss der Behandlung und des Spenderhintergrunds auf die Histologie

Kontrolle



Ethanol + NaCl



Ethanol + Prednisolon

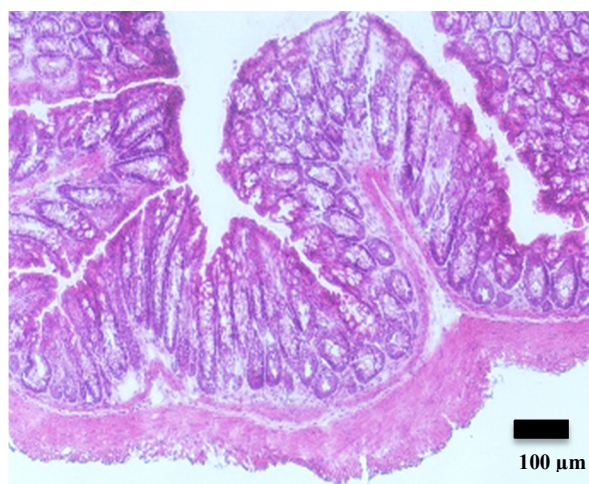


Abb. 10: Exemplarische Bilder des histologischen Querschnittes des Kolons in Abhängigkeit von der Behandlung.

In den exemplarischen Bildern (Abb. 10) der histologischen Schnitte der behandelten Tiere zeigen sich in der Ethanol + NaCl-Gruppe in der Mucosa überwiegend architektonisch regelhafte, parallel angeordnete Krypten. Stellenweise ergibt sich jedoch der Eindruck eines geringen Kryptenverlustes sowie eines fraglichen Becherzellverlustes sowie einer geringgradigen schleimhaut-assoziierten rundzelligen Infiltration. In der Submucosa zeigt sich ein geringgradiges Stromaödem. Die histologischen Präparate der Kontrollgruppe, sowie der Ethanol + Prednisolon Gruppe zeigten entzündungsfreie, kriptenarchitektonisch regelhafte Kolonschleimhaut.

Durchflusszytometrische Analyse des Kolons

Um den Effekt des Reizes und der Therapie auf Immunzellen im Kolon beurteilen zu können wurde das Kolon, wie in Material und Methoden beschrieben, einer durchflusszytometrischen Analyse unterworfen.

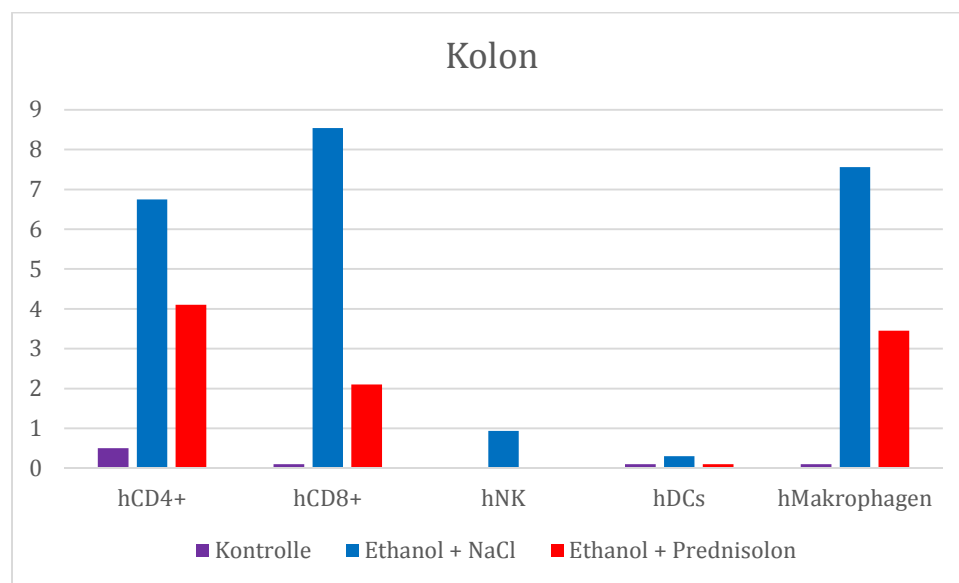


Abb. 11: Effekt der Therapie auf das Einwandern der Immunzellen in das Kolongewebe. Betrachtet werden hCD4⁺ Zellen, hCD8⁺ Zellen, humane Natürliche Killerzellen (hNK), humane Dendritische Zellen (hDCs) sowie humane Makrophagen.

Da die Frequenz der immunologischen Zellen im Kolon gering ist, wurden die Zellen aus Kolonsegmenten der behandelten Gruppe vereinigt und zusammen analysiert und in Abb. 11 dargestellt.

In der Kontrollgruppe zeigte sich eine Frequenz der hCD4⁺ Zellen im Kolon von 0,5 %. Eine deutliche Zunahme der Frequenz auf 6,75 % stellte sich in der Ethanol + NaCl-Gruppe dar. Die Prednisolonbehandlung wirkte sich mit einem Abfall der Frequenz auf 4,1 % aus.

Auch die hCD8⁺ Zellen im Kolon zeigten in der Ethanol + NaCl-Gruppe ein deutliches Ansteigen der Frequenz von 0,1 % in der Kontrollgruppe auf 8,54 %. Die Ethanol + Prednisolon Gruppe zeigte mit 2,1 % einen deutlich niedrigeren Wert.

Die humanen Natürlichen Killerzellen (hNK) zeigten ein Ansteigen der Frequenz von 0,0,2 % in der Kontrollgruppe auf 0,94 % in der Ethanol + NaCl-Gruppe. Die Ethanol + Prednisolon Gruppe zeigte mit 0,018% ähnliche Werte wie die Kontrollgruppe.

Die Frequenz der humanen dendritischen Zellen war niedrig. Bei den humanen Dendritischen Zellen (hDCs) waren die Werte von Kontrollgruppe und Ethanol + Prednisolon-Gruppe mit 0,1 % identisch. Einen geringgradig erhöhten Wert zeigte die Ethanol + NaCl-Gruppe mit 0,3%.

Humane Makrophagen fanden sich in der Kontrollgruppe in einer Frequenz von 0,1 % während in der Ethanol+NaCl ein deutlicher Anstieg auf 7,56 % stattfand. Die mit Prednisolon behandelten Tiere zeigten einen Abfall der Frequenz von auf %.

Testung eines Th2 Inhibitors

Um die zweite wissenschaftliche Fragestellung der Effektivität und Anwendbarkeit des Th2-Inhibitors in diesem Tiermodell zu prüfen, wurde Experiment B um eine zusätzliche Versuchsgruppe von 4 Tieren erweitert. In dieser mit einem Th2-Inhibitor behandelten Gruppe wurden alle vorangegangenen Immun-Parameter erfasst und mit den bereits erwähnten Ergebnissen verglichen.

Einfluss des Th2-Inhibitors auf den Rekonstitutionsgrad

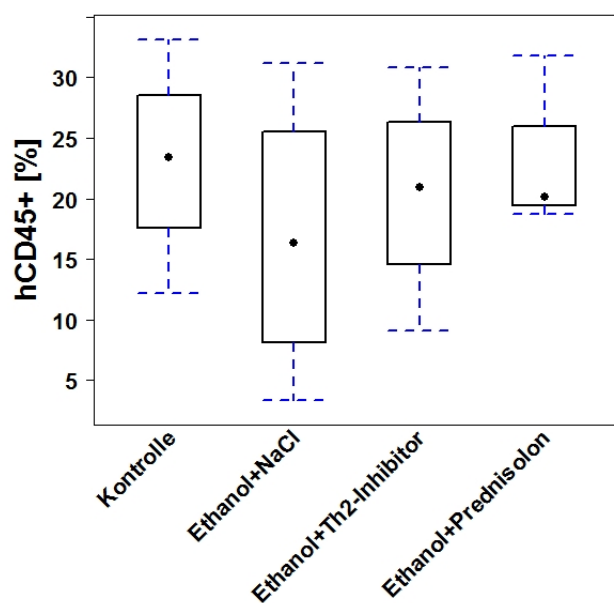


Abb. 12: Boxplot Graphik - Anteil humaner CD45 Zellen in der Gesamtymphozyten Population der Maus in Abhängigkeit von der Behandlung.

Der Rekonstitutionsgrad wurde wie in Abb. 12 und Anhang 8 gezeigt nicht durch den Th2-Inhibitor beeinflusst. Der Rekonstitutionsgrad der Ethanol + Prednisolon-Gruppe ($20,1 \pm 7,19$ %) war ähnlich zu der Ethanol + Th2-Inhibitor-Gruppe, mit einem Anteil humaner CD45+ Zellen an der Gesamtymphozytenpopulation von $20,95 \pm 8,90$ %.

Einfluss des Th2-Inhibitors auf den klinischen Aktivitätsscore

Die Bestimmung des klinischen Aktivitätsscore erfolgte gemäß der im Validierungsexperiment erwähnten Tabelle 4.

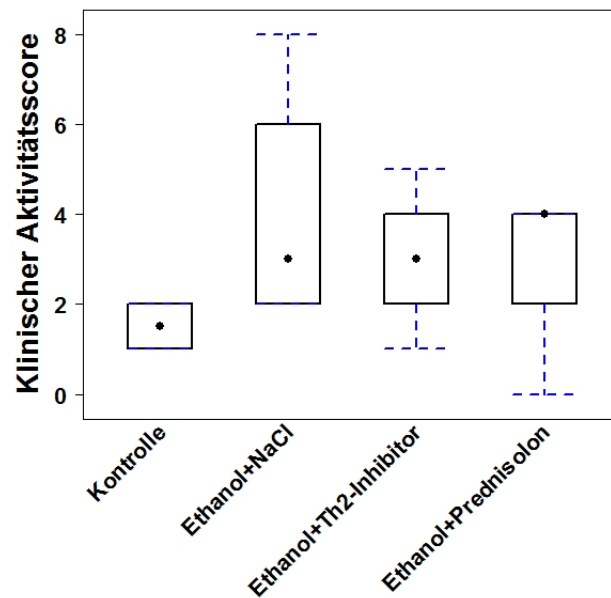


Abb. 13: Boxplot Graphik - Klinischer Aktivitätsscore in Abhängigkeit von der Behandlung.

Die Behandlung mit dem Th2-Inhibitor zeigt, wie in Abb.13 gezeigt, keinen Einfluss auf das klinische Bild wenn man es mit den Ethanol + NaCl-behandelten Tieren vergleicht ($3 \pm 1,63$ zu $3 \pm 2,82$).

Einfluss des Th2-Inhibitors auf T-Zellen

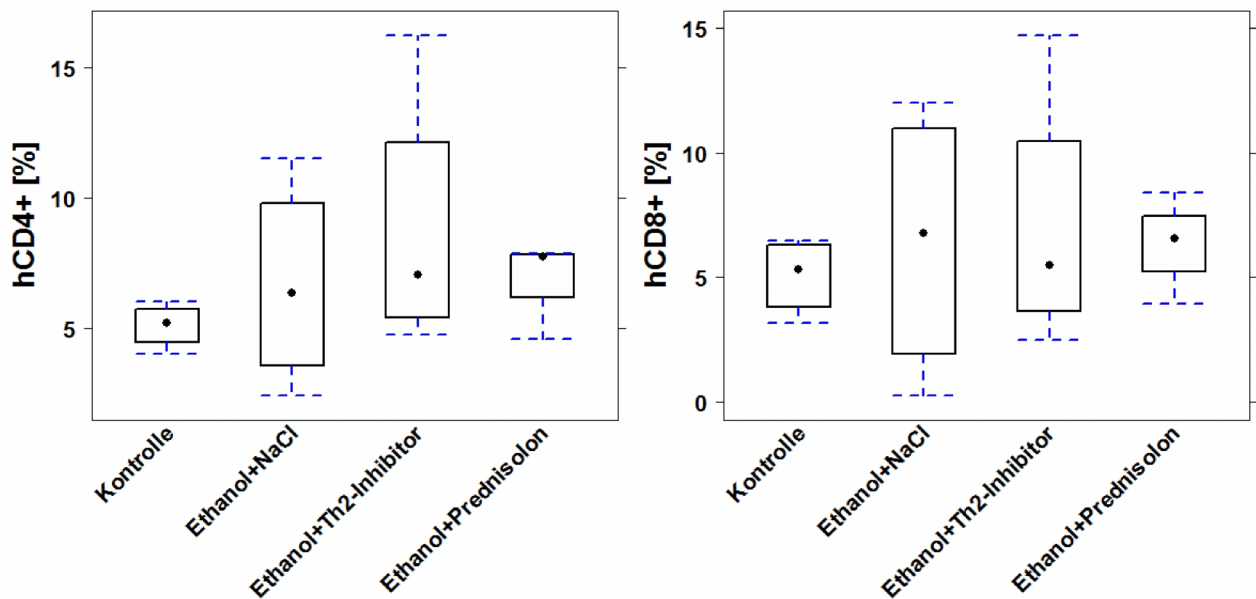


Abb. 14: Boxplot Graphik - Frequenz humaner T-Zellen ($hCD4^+$ und $hCD8^+$) in Abhängigkeit von der Behandlung.

$hCD4^+$ und $hCD8^+$ Zellen

In Abb. 14 und Anhang 9 ist die Frequenz der $CD4^+$ Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung dargestellt. Insgesamt konnte man auch bei Einsatz des Th2-Inhibitors einen mäßigen Effekt auf die Frequenz sowohl der $hCD4^+$, als auch der $hCD8^+$ T-Zellen sehen. Die $hCD4^+$ -T Zellpopulation zeigte relativ konstante Werte zwischen der Ethanol + NaCl-Gruppe mit $6,37 \pm 3,96 \%$ und der Ethanol + Th2-Inhibitorgruppe mit $6,08 \pm 1,66 \%$. Bei der $hCD8^+$ T Zellpopulation fand sich eine etwas erniedrigte $hCD8^+$ Population in der Th2-inhibierten Gruppe mit $4,79 \pm 1,88\%$ im Vergleich zur Ethanol + NaCl-Gruppe mit $6,75 \pm 5,47 \%$.

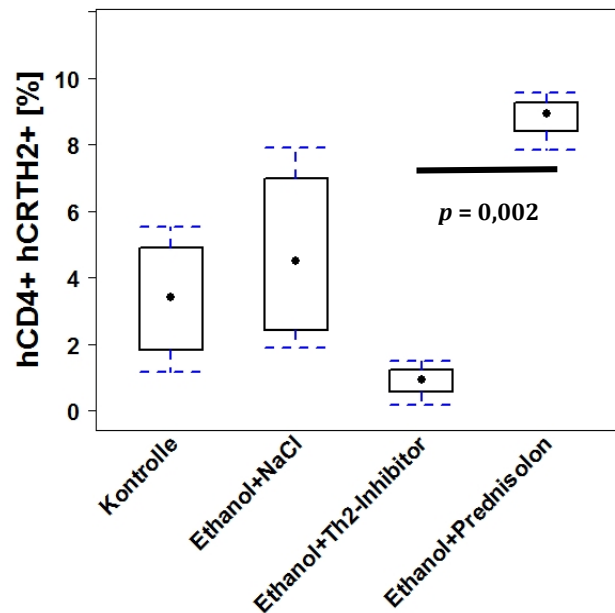
hCD4⁺ hCRTH2⁺- Zellen

Abb. 15: Boxplot Graphik – Frequenz der Th2 Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.

Ein deutlicher Effekt des Th2-Inhibitors wurde auf die Th2 Population beobachtet (Abb. 15 und Anhang 10). Wie erwartet, verliert die hCD4⁺ hCRTH2⁺ Population deutlich an der Größe von $4,50 \pm 2,78$ % auf $0,91 \pm 0,66$ % zwischen der Ethanol+NaCl und der Ethanol + Th2-Inhibitor-Gruppe. Der Unterschied zwischen der Ethanol + Prednisolon Gruppe-Gruppe und der mit dem Th2-Inhibitor behandelten Gruppe zeigt den deutlichsten Unterschied mit einem Wert von $8,94 \pm 3,84$ % zu $0,91 \pm 0,66$ % und ist mit einem p-Wert von 0,0022605 statistisch signifikant.

Einfluss des Th2-Inhibitors auf das Verhältnis von aktivierten und naiven hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen

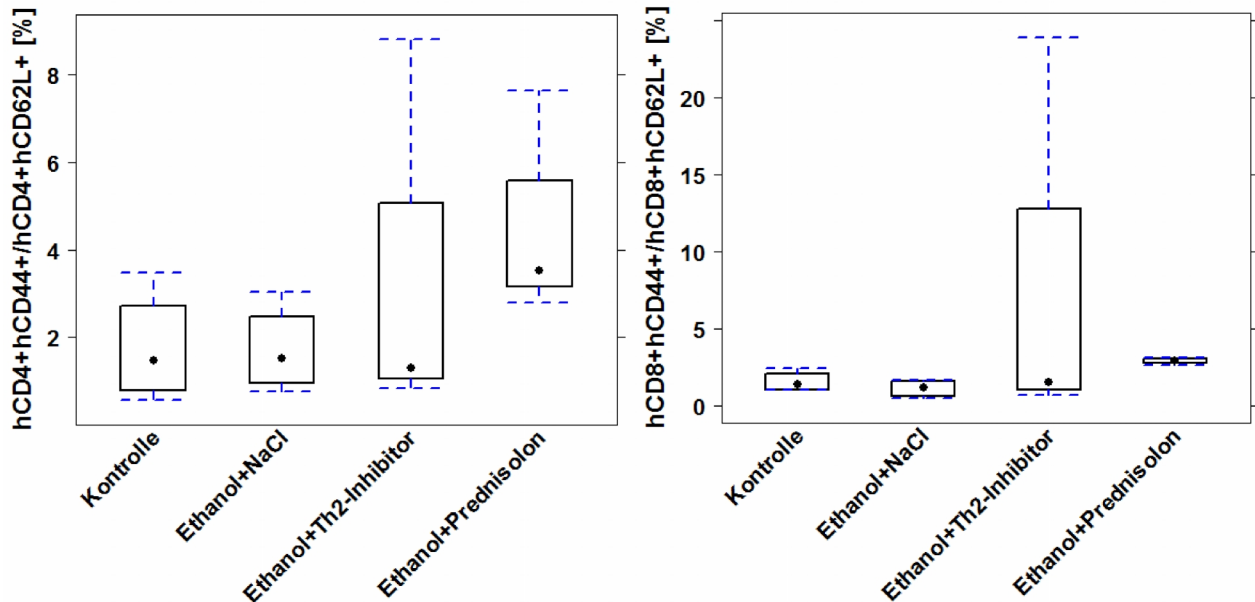


Abb. 16: Boxplot Graphik - Verhältnis von aktivierten zu naiven hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.

In Abb 16 und Anhang 11 wird dargestellt dass der Th2-Inhibitor im Gegensatz zu Prednisolon keinen Einfluss auf das Verhältnis von aktivierten zu naiven hCD4⁺ Zellen. Auch beim Verhältnis von aktivierten zu naiven hCD8⁺ T-Zellen hat der Th2-Inhibitor keinen Einfluss. Der Wert von $(1,3 \pm 3,84):1$ (hCD4⁺) und $(1,52 \pm 11,31):1$ (hCD8⁺) zeigt keinen wesentlichen Unterschied zur Kontrollgruppe oder Ethanol + NaCl-Gruppe.

Einfluss des Th2-Inhibitors auf B-Zellen und IgE und IgG-Werte

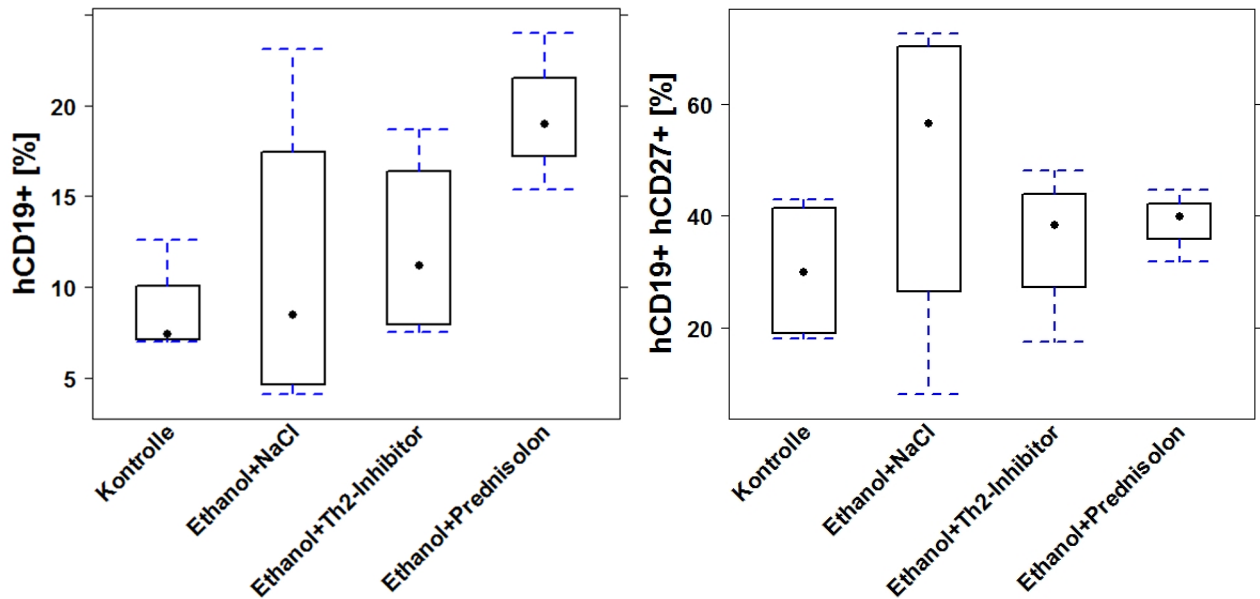


Abb. 17: Boxplot Graphik – Frequenz der B-Zellen (hCD19⁺, links) und aktivierten B-Zellen (hCD19⁺hCD27⁺, rechts) in Abhängigkeit von der Behandlung.

B-Zellen und aktivierte B-Zellen

In Abb. 17 und Anhang 12 ist gezeigt, dass der Th2-Inhibitor die Frequenz der B-Zellen nicht beeinflusst. Diese blieb mit $8,27 \pm 3,60$ % im Vergleich zur Ethanol + NaCl-Gruppe mit $8,45 \pm 8,74$ % relativ konstant. Hier unterscheidet sich die Wirkung des Th2-Inhibitors von der des Prednisolons. Wie schon beschrieben stieg durch die Behandlung mit Prednisolon die Frequenz der B-Zellen an. Die Frequenz der aktivierten B-Zellen wurde durch den Th2-Inhibitor von $56,50 \pm 29,58$ % (Ethanol + NaCl Gruppe) auf $39,80 \pm 15,92$ % gesenkt. Dieser Wert ist mit dem der Ethanol + Prednisolon-Gruppe ($39,80 \pm 15,92$ %) vergleichbar.

Die Größe der hCD19⁺hCD27⁺ Population war in der Th2-Inhibitor-behandelten Gruppe im Vergleich zur Ethanol+NaCl behandelten Gruppe deutlich kleiner. Die Aktivierung der B-Zellen wurde von $56,50 \pm 29,58$ % auf $39,80 \pm 15,92$ % gesenkt. Dieser Effekt ist vergleichbar dem von mit Prednisolon.

hIgG und hIgE

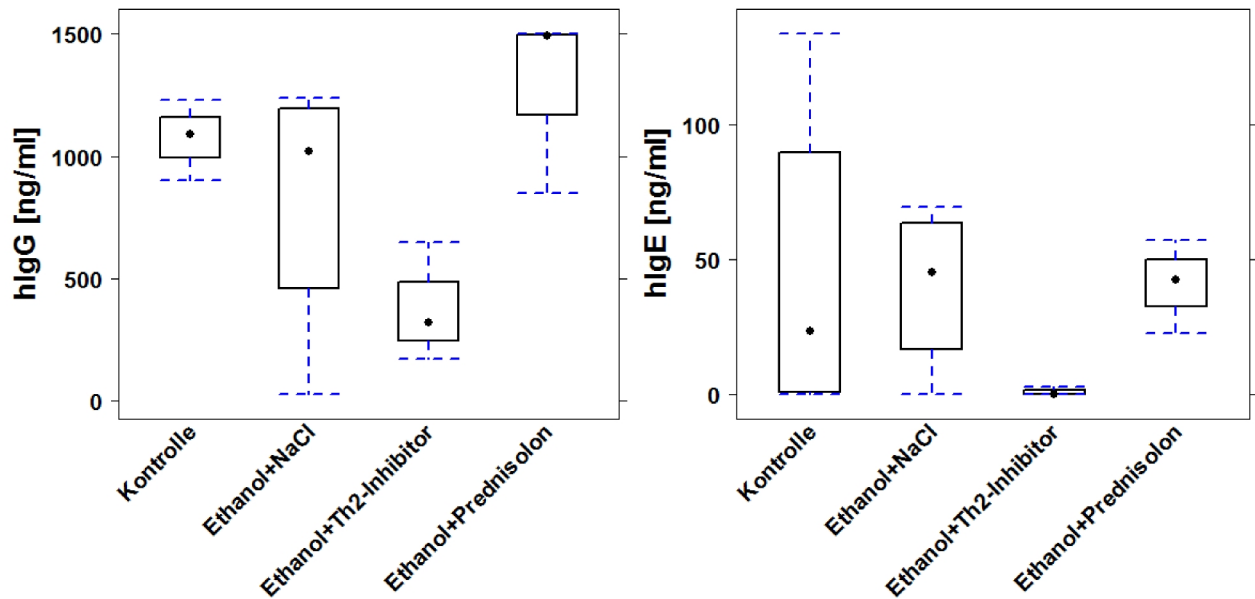


Abb. 18: Boxplot Graphik – Serumkonzentration der hIgG und hIgE Antikörper in Anhängigkeit von der Behandlung.

In der Abbildung 18 wird die Wirkung des Th2-Inhibitors sehr deutlich. In Anwesenheit des Th2-Inhibitors wurde eine drastische Abnahme der beiden Immunoglobuline von $1020,00 \pm 551,99$ % in der Ethanol + NaCl behandelten Gruppe auf $320,00 \pm 245,56$ % für hIgG und von $45,12 \pm 30,61$ % auf $0,00 \pm 1,39$ % für hIgE beobachtet. Auch hier sieht man einen deutlichen Unterschied zu der Wirkung des Prednisolons.

Einfluss des Th2-Inhibitors auf die Kolonlänge

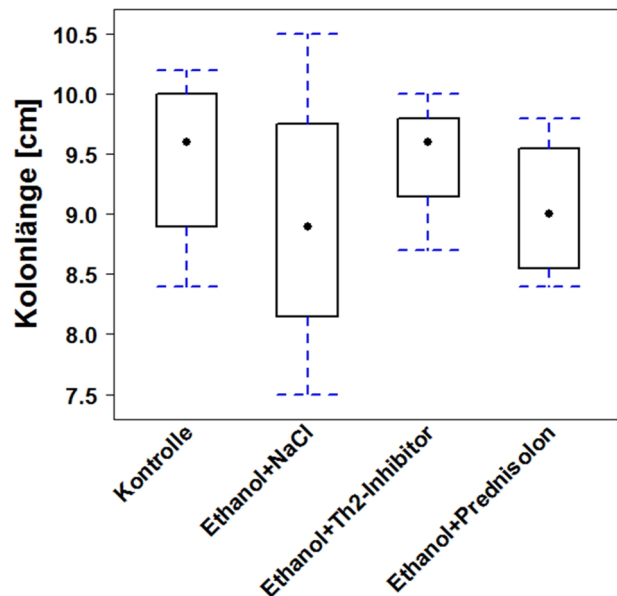


Abb. 19: Boxplot Graphik - Kolonlänge in Abhängigkeit von der Behandlung.

Der Einsatz des Th2-Inhibitors führt, wie in Abb. 19 gezeigt, bei den Tieren zu einer völligen Erhaltung der Darmlänge im Vergleich zu den Kontrolltieren ($9,6 \pm 0,77$ cm zu $9,6 \pm 0,67$ cm).

Durchflusszytometrische Analyse des Kolons

Einfluss der Therapie auf die infiltrierten Immunzellen des Kolons

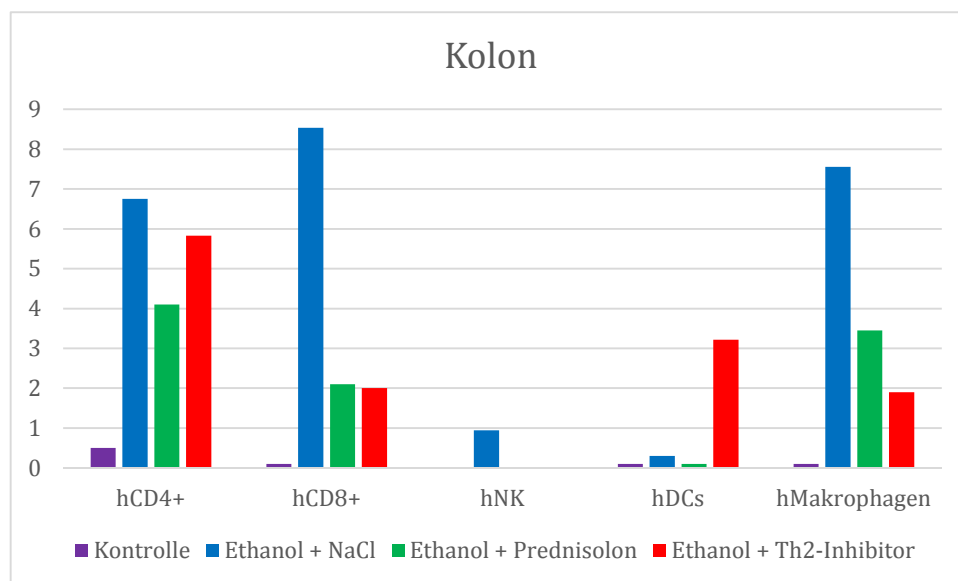


Abb. 20: Effekt der Behandlung auf das Einwandern der Immunzellen in das Kolon. Betrachtet werden hCD4⁺ Zellen, hCD8⁺ Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), Dendritische Zellen (DCs) sowie Makrophagen.

In der durchflusszytometrischen Analyse des Kolons (Abb. 20) konnte in der Ethanol + Th2-Inhibitor-Gruppe bei den hCD4⁺ Zellen mit 5,83 % gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe lediglich ein geringer Abfall der Zellfrequenz beobachtet werden. Die hCD8⁺ Zellen zeigten einen deutlichen Abfall auf 2 % gegenüber 8,54 % in der Ethanol + NaCl-Gruppe. Bei den natürlichen Killerzellen erfolgte ein Abfall von 0,94 % auf 0,019 %. Die Dendritischen Zellen zeigten eine deutliche Zunahme gegenüber aller anderen Gruppe auf 3,22 %. Die Frequenz der Makrophagen war mit 1,9 % deutlich geringer als in der Ethanol + NaCl-Gruppe mit 7,56 %.

Einfluss des Th2-Inhibitors auf das histologische Bild des Kolons

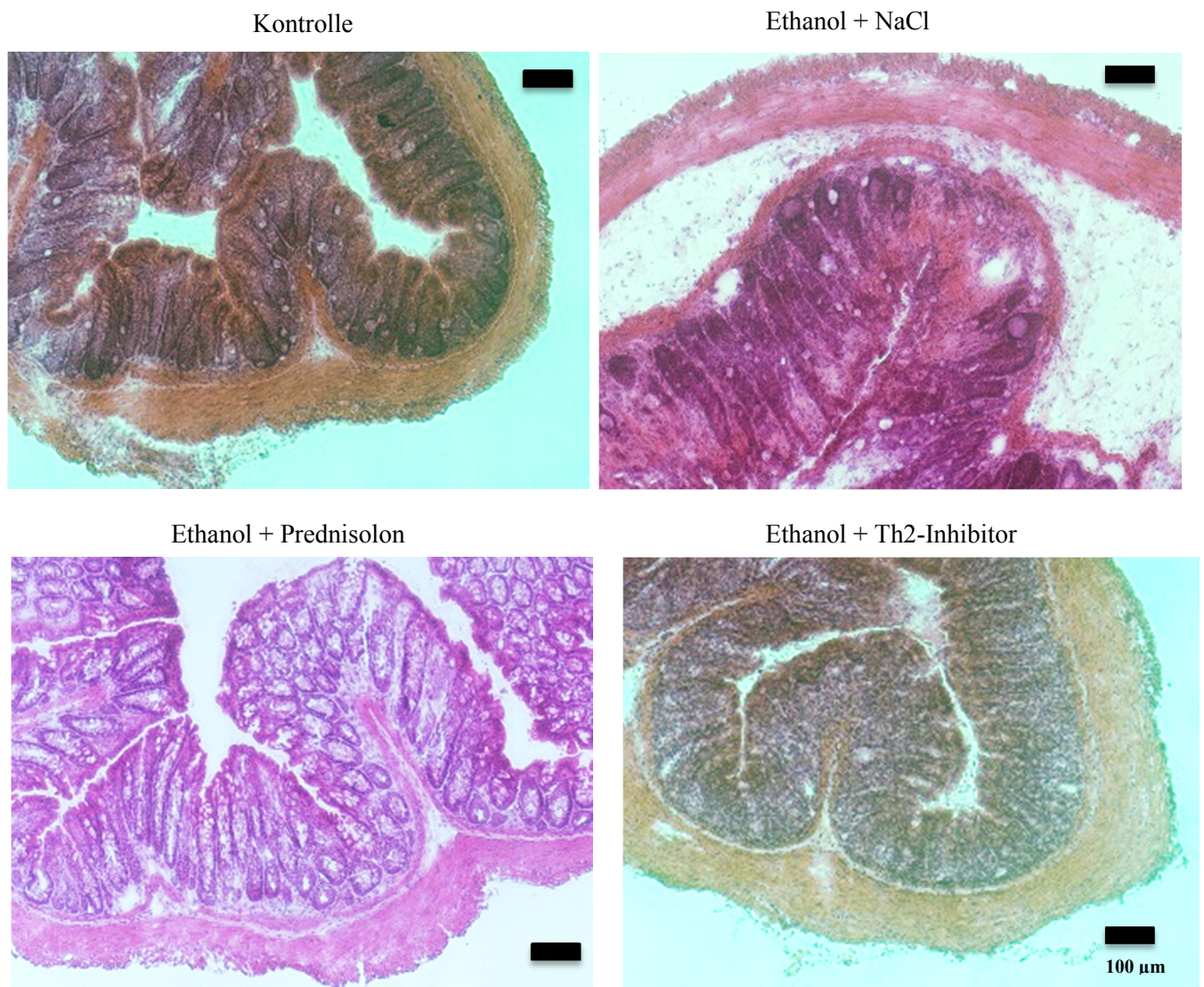


Abb. 21: Repräsentative histologischer Querschnitt des Kolons in Abhängigkeit von der Behandlung.

In dem histologischen Schnitt des Kolons (Abb.32) der Th2-Inhibitor behandelten Gruppe sieht man, genauso wie in der Kontrollgruppe, eine entzündungsfreie Kolonschleimhaut mit regelhafter Kryptenarchitektur.

Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des immunologischen Hintergrunds der Spender und des Therapeutikums Prednisolon in dem von uns etablierten Mausmodell getestet. Als Maß für die Entwicklung der Kolitis und der Wirkung des Prednisolons diente der Aktivitätsscore, die hIgG und hIgE Sekretion, sowie die Frequenz von Immunzellen in der Milz und im Kolon der Mäuse. Als weitere Merkmale wurden die Kolonlänge und die Histologie des Kolons hinzugezogen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Inhibitor getestet, der spezifisch die Th2 vermittelte Immunantwort unterdrückt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bis zu einem gewissen Maß die Reaktionen des Immunsystems der rekonstituierten Mäuse das Immunsystem der Spender widerspiegelte und das Tiermodell sich für die Testung von Inhibitoren eignet, die humane Zielmoleküle adressieren.

Zu den Hypothesen 1.1-1.3

Wie erwartet entwickelte keine der Mäuse der Kontrollgruppen eine spontane Kolitis oder die Symptome einer Graft-versus-host-disease [43]. Weder Verhalten, noch Gewichtsverlauf, noch die Konsistenz des Kots deuteten darauf hin. Da die Kolonlänge sowohl in vorangegangenen Studien [30], als auch in anderen Tiermodellen zur Induktion einer Colitis, als ein Maß für die Entwicklung einer Kolitis gilt [35, 36], liefern die fehlende Verkürzung des Kolons und die Histologie des Kolons keine Hinweise auf die Entwicklung voran genannter Erkrankungen. Allein die Präsenz der humanen Immunzellen genügt also nicht, sondern es bedurfte eines zusätzlichen Reizes, um die Symptome einer Colitis auszulösen. Dies bestätigte die von Nolte *et al.* gezeigten Ergebnisse [30].

Zu den Hypothesen 2.1 und 2.2

Bereits durch den Transfer werden sowohl B- als auch T-Zellen aktiviert. Die Frequenz von B- und T-Zellen erhöhte sich im Vergleich zu den Frequenzen, die in den PBMCs der Spender gemessen wurden. Auch die messbaren IgG-Serumspiegel in beiden Kontrollgruppen sprechen für eine Aktivierung der B-Zellen durch den Transfer. Das Verhältnis von aktivierten hCD4⁺ Zellen zu naiven hCD4⁺ Zellen erreichte jedoch nicht den in der Milz von BALB/c Mäusen gemessenen Wert. In den rekonstituierten Mäusen wurde ein Verhältnis von aktivierten zu naiven Zellen von 1,77:1 gemessen. In der Milz der BALB/c Maus beträgt das Verhältnis jedoch 4:1 [44]. Damit blieb das Verhältnis und damit der Aktivierungsgrad des Immunsystems in den immun-rekonstituierten Mäusen unter dem der immun-kompetenten BALB/c Mäuse.

Zu den Hypothesen 3.1 und 3.2

Der Spenderhintergrund beeinflusst den Rekonstitutionsgrad und damit die Frequenz der T- und B-Zellen. Die Tiere in Experiment A, die mit PBMC eines Spenders in der Abklingphase eines Erkrankungsschubs rekonstituiert waren, wiesen einen geringeren Rekonstitutionsgrad auf als die Tiere in Experiment B. Die Tiere in Experiment B, die mit PBMCs eines Spenders im Erkrankungsschubs rekonstituiert waren, einen höheren. Der höhere Rekonstitutionsgrad schlug sich auch in der Frequenz der B- und T-Zellen und in den höheren IgG und IgE Werten nieder. Einer der möglichen Gründe dafür ist, dass Zellen, die durch ein stärkeres entzündliches Milieu geprägt sind, schon einen voraktivierten Phänotyp haben und nach dem Transfer besser expandieren und somit für diese Modelle von vornherein besser geeignet sind [45-47].

Zu den Hypothesen 4.1-4.3

Wie im leichten Anstieg des klinischen Aktivitätsscores zu sehen ist, löste der Reiz durch Ethanol geringgradige Symptome einer Kolitis aus, die sich in einer weichen Beschaffenheit des Kots und ein einem geringgradigen Gewichtsverlust bemerkbar machten. In keiner Maus war der Kot blutig, was ebenfalls für eine milde Form der Kolitis spricht. Dies wurde auch durch den klinischen Aktivitätsscore deutlich, der in beiden Experimenten niedrig war, wenn man den maximal erreichbaren klinischen Aktivitätsscore von 24 zu Grunde legt. Die Entzündung äußerte sich auch in einer geringfügigen Verkürzung des Kolons, die jedoch deutlich geringer ausfällt als in der durch DSS induzierten Kolitis in immun-kompetenten BALB/c Mäusen [36]. Auch die leichten histopathologischen Veränderungen sprechen für eine sehr milde Form der Kolitis. Diese Veränderungen sind durch Entzündungs- und Umbauvorgänge auf zellulärer Ebene zu erklären, die durch die immunologischen Vorgänge induziert werden [36]. Die klinischen Symptome die wir in unseren Experimenten zeigten, dienen zur klinischen Darstellung der Colitis ulcerosa besser, als die toxischen und oft letalen Verläufe in der durch Heller *et al.* beschriebenen Oxazolone Colitis [29].

Zu der Hypothese 4.4

Der Reiz mit Ethanol erniedrigte den Rekonstitutionsgrad der Versuchstiere. Eine Erklärung hierfür ist das es durch den Ethanolreiz zu einer Aktivierung des immunologischen Kompartiments kommt. Durch diese Aktivierung gehen viele Zellen durch aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD=Activation induced celldeath) in die Apoptose [48].

Zu den Hypothesen 4.5-4.6

Durch Ethanol wurde eine entzündliche Antwort ausgelöst, die in der zusätzlichen Aktivierung von B-Zellen und der Expansion der hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen resultierte. Dies deutet auf ein funktionelles Immunsystem in den Mäusen hin.

Zu den Hypothesen 5.1-5.4

Der Spenderhintergrund hat einen wesentlichen Einfluss auf die Reaktion mit Ethanol. So war der klinische Aktivitätsscore in Experiment A geringer als in Experiment B. In Experiment A ließ sich die hIgE und hIgG Sekretion durch die Applikation stimulieren, in Experiment B konnte kein weiterer Anstieg beobachtet werden. Dies entsprach der Frequenz der B-Zellen, die in Experiment A leicht erhöht war, in Experiment B hingegen nicht. Die Beobachtung, dass in beiden Experimenten die Frequenz der aktivierten B-Zellen durch den Ethanol-Reiz erhöht war, deutet darauf hin, dass dieser ausreichend war. Der zusätzliche Reiz resultierte jedoch nicht in einer vermehrten Sekretion von hIgE und hIgG in Experiment B. Dies könnte in einer Sättigung des inflammatorischen Milieus begründet sein. In beiden Experimenten wurde eine leichte Erhöhung der Frequenz der hCD4⁺ und hCD8⁺ Zellen beobachtet. In Experiment A jedoch war das Ausgangsniveau beider Zellpopulationen deutlich geringer. Dies reflektiert die Werte, die in den PBMCs der Patienten gemessen wurden und deutet darauf hin, dass in dieser Hinsicht der immunologische Hintergrund der Spender erhalten bleibt. Dies zeigt sich auch in dem höheren klinischen Aktivitätsscore der Mäuse in Experiment B, was das durch vermehrt entzündliche Prozesse stärker aktiviertere Immunsystem des Spenders widerspiegelt. Das Maß der Aktivierung der hCD4⁺-Zellen, das durch das Verhältnis der aktivierten hCD4⁺-Zellen zu naiven hCD4⁺-Zellen bestimmt wurde, war in beiden Experimenten vergleichbar. Da in diesem Modell nur die aktivierten T-Zellen expandieren sollten, und sich das Verhältnis der aktivierten zu den naiven Zellen durch den Reiz nicht ändert, beruht die erhöhte Frequenz der hCD4⁺ Zellen vermutlich auf durch die Rekonstitution hervorgerufene Variationen. Die abnehmende Frequenz der aktivierten hCD8⁺ Zellen in der Ethanol + NaCl-Gruppe könnte auf eine höhere Apoptose-Rate der aktivierten hCD8⁺ Zellen hindeuten.

Zu den Hypothesen 6.1-6.3

Es wurde eine Erhöhung des klinischen Aktivitätsscores in der Prednisolon-behandelten Gruppe gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe gezeigt. Eine mögliche Erklärung wäre der

Effekt des durch Karatsoreos *et al.* gezeigten Einflusses von Glucocorticoiden auf endokrine und psychologische Abläufe in der Maus [49]. Auch die Kolonlänge zeigt sich relativ unverändert durch die Prednisolonbehandlung gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe, was sich, mit einer zu geringen Therapiedosis oder Dauer erklären lassen könnte. Jedoch sollte man bei der Beurteilung der Kolonlänge auch die mäßige Verkürzung der Ethanol + NaCl-Gruppe beachten. Das pathohistologische Bild des Kolons der Ethanol + Prednisolon-Gruppe hingegen war gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe abgemildert, was eine therapeutische Wirkung des Prednisolons nahelegt.

Zu den Hypothesen 6.4-6.5

Der Spenderhintergrund hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Wirksamkeit von Prednisolon in diesem Modell. Spender A hatte auf eine Therapie mit Prednisolon angesprochen und die Ansprache auf Prednisolon ließ sich im Tiermodell nachbilden. Die Behandlung der Mäuse des Experiments A mit Prednisolon schlug sich in der verminderten Sekretion von hIgG und hIgE, sowie einer verminderten Frequenz von B- und aktivierten B-Zellen nieder. Dies entspricht der zu erwartenden pleiotropen, immunsuppressiven Wirkung von Prednisolon [50]. Spender B hingegen, der auch nach jahrelanger Behandlung mit Glukokortikoid, Mesalazin und Adalimumab, unter einer starken Kolitis litt, zeigte sich auch im Tiermodell in manchen Aspekten refraktär gegenüber Prednisolon. Dies betraf die Sekretion von hIgG und hIgE und die Frequenz der B-Zellen. Lediglich bei der Aktivierung der B-Zellen und der Aktivierung der hCD8⁺ Zellen konnte in beiden Experimenten eine therapeutische Wirkung von Prednisolon gezeigt werden. Die Aktivierung der B-Zellen wurde vermindert, wohingegen die Frequenz der hCD19⁺Zellen anstieg. Für diesen Umstand haben wir derzeit keine schlüssige Erklärung.

Diese Ergebnisse bedeuten aber auch, dass Prednisolon als Referenz zur Wirksamkeit eines Therapeutikums nur mit Einschränkung herangezogen werden kann, da der Spenderhintergrund die Wirkung des Prednisolons stark beeinflusst.

Zu der Hypothese 7.1-7.3

Inhibitoren der Th2 Zellen könnten eine attraktive Alternative zu den gängigen Therapien sein. Die therapeutische Wirkung des Th2-Inhibitors konnte zwar beim klinischen Aktivitätsscore nicht gezeigt werden. Dieses Ergebnis ist jedoch aufgrund des allgemein sehr niedrigen Levels des klinischen Aktivitätsscores gegenüber des maximal erreichbaren Wertes von 24 wenig aussagekräftig und lässt sich mit einem statistischen Bodeneffekt erklären. Der positive Effekt

auf die Kolonlänge, die einwandernden Immunzellen und einer damit fehlenden Verkürzung des Kolons durch den Th2-Inhibitor bestärkt uns hingegen in der Vermutung der therapeutischen Wirkung des Th2-Inhibitors, und lässt sich durch einen Eingriff des Th2-Inhibitors auf IL-4 Ebene in den IL-4/IL-13 pathogenitätsinduzierenden Kreislauf der Colitis ulcerosa erklären [51]. Dieser Effekt zeigt sich auch im histologischen Bild in dem man den fehlenden pathohistologischen Befund gegenüber der Ethanol + NaCl-Gruppe sieht. Auch diesen Befund führen wir auf den Eingriff des Th2-Inhibitors in den immunologischen Prozess einer Th2-dominierten Entzündung zurück.

Zu der Hypothese 7.4

In der mit Th2-Inhibitor behandelten Gruppe ist eine leichte Erhöhung der Frequenz humaner CD45⁺ Zellen gegenüber der Ethanol + NaCl Gruppe zu sehen. Wie auch innerhalb der Ethanol + Prednisolon Gruppe erklären wir diesen Umstand durch den entzündungshemmenden Einfluss des Th2-Inhibitors auf die Zellen des Immunsystems.

Zu den Hypothesen 7.5 -7.7

Der immunologische Spenderhintergrund und die mangelnde Antwort auf die Kombinationstherapie deuteten darauf hin, dass in diesem Fall eine Therapie mit einem Th2-Inhibitor erfolgreich sein könnte. Wie erhofft wirkt der Th2-Inhibitor entzündungshemmend, die Frequenz der hCD4⁺ und hCD8⁺-Zellen wurde durch den Inhibitor nur leicht verringert. Da die Wirkung des Th2 Inhibitors auf der Inhibition der Proliferation und Differenzierung der Th2-Zellen beruht, war der größte Effekt auf die Frequenz der Th2 Zellen zu erwarten. Wie erhofft, verringert der Inhibitor die Frequenz erheblich. Dies ist ein wichtiger Nachweis für die spezifische Wirkung des Th2-Inhibitors in vivo.

Die verringerte Frequenz der Th2-Zellen resultiert auch in einer verringerten Aktivierung der B-Zellen sowie in einer Blockade der IgG- und IgE-Sekretion. Dieser Effekt wird vermutlich dadurch verstärkt, dass der IL-4R auch auf B-Zellen exprimiert wird [52].

Zusammengefasst kann man sagen, dass durch diese Arbeiten gezeigt wurde, dass dieses Tiermodell geeignet ist, Inhibitoren gegen humane Rezeptoren zu testen, die auf den humanen Immunzellen exprimiert sind und so möglicherweise Studien in nicht-humanen Primaten ersetzen könnte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Spenderhintergrund einen großen Einfluss auf die Ausprägung der Entzündung und die Ansprache auf Therapeutika hat. Weitere Experimente müssen dies jedoch erhärten. Nicht zuletzt scheint die Entwicklung eines Th2-

Inhibitors eine vielversprechende Alternative für die weitere Behandlung von Colitis ulcerosa Patienten zu sein.

Bewertung des Tiermodells

Das in dieser Arbeit beschriebene Tiermodell weist die gleichen klinischen und histologischen Charakteristika auf wie das Modell der Oxazolone-induzierten Kolitis, sowie das Modell der DSS induzierten Kolitis in BALB/c Mäusen [29]. Es zeigt jedoch nicht die hohe Mortalität der Oxazolone Colitis, die vermutlich durch die starke toxische Wirkung des Oxazolons verursacht wird. Die deutlich mildere Verkürzung des Kolons in unserem Modell, gegenüber der DSS induzierten Kolitis, spricht für eine induzierte milde Form der Kolitis [36]. Durch eine Erhöhung der Zellzahl an rekonstituierten Zellen würde unser Modell wahrscheinlich auch im klinischen Aktivitätsscore die Symptome der Kolitis besser widerspiegeln. Das Zusammenspiel des immunologischen Spenderhintergrunds mit dem vergleichsweise schwachen toxischen Reiz durch Ethanol könnte bedeuten, dass dieses Modell die immunologischen Abläufe der menschliche Colitis besser widerspiegelt als die beiden anderen angeführten Tiermodelle. Diese Annahme wird auch dadurch erhärtet, dass der Einfluss von Alkoholkonsum auf die Schubfrequenz von Colitis ulcerosa Patienten beschrieben ist [53]. Die geringe Varianz des Rekonstitutionsgrads und die klaren Ergebnisse zeigen, dass dieses Tiermodell robust ist, und auch bei relativ geringer Gruppengröße eindeutige Aussagen getroffen werden können. Der Einfluss des Spenderhintergrunds auf die Entwicklung der Symptome und die Ansprache auf Prednisolon zeigen, dass dieses Tiermodell möglicherweise eine höhere Aussagekraft für spätere klinische Studien hat als gängige Tiermodelle. Im Gegensatz zu unserem Modell beruhen diese auf immun-kompetenten Inzucht Stämmen, die sich hinsichtlich des genetischen Hintergrunds, dem Alter und der Dauer der Krankheit wesentlich von der heterogenen Population der Colitis ulcerosa Patienten unterscheiden.

Die Wirkung des Th2-Inhibitors ist ein erster Hinweis für die Anwendbarkeit dieses Tiermodells in der Testung von Medikamenten, die auf humane Zielmoleküle abzielen und die eine hohe Sequenzhomologie erfordern.

Das in dieser Arbeit untersuchte Tiermodell bietet neben deutlichen Vorteilen auch Limitationen. So unterliegt es neben den üblichen Variablen eines Tierversuchs wie zum Beispiel dem Einfluss des Experimentators, zusätzlichen Variablen wie dem Rekonstitutionsgrad [30-32] und dem immunologischen Einfluss des Spenders. Eine einfache Übertragbarkeit der Ergebnisse eines Versuchs ist nicht möglich, da diese Ergebnisse immer

nur im Zusammenhang mit dem Spenderhintergrund diskutiert werden können. Dies bedeutet auch, dass gängige Vergleichstherapeutika wie zum Beispiel Prednisolon nur eingeschränkt verwendet werden können. Dieses Modell ist auch für Aufklärung genereller immunologischer Mechanismen nur eingeschränkt nutzbar. Dazu trägt auch die begrenzte Lebensdauer der Mäuse bei. Das Zeitfenster der Versuche, von circa 30 Tagen, schließt es aus Phasen von Remission und Schub in diesem Modell nachzustellen. Auch die Chronizität der Erkrankung kann durch das einer graft-versus-host disease geschuldete limitierte Zeitfenster nicht nachgebildet werden [34].

Aber in den Limitationen des Tiermodelles durch die unterschiedlichen spenderbasierten Reaktionen der Mäuse auf den Reiz und die Behandlung liegt die größte Stärke des Tiermodelles. Denn dieses humanisierte Immunsystem in der Maus bietet weitreichende Möglichkeiten für die Entwicklung und Erprobung personalisierter Therapien, sowie möglicherweise die Option individuelle Krankheitsverläufe in der Maus besser nachvollziehen zu können. So haben wir durch den Einsatz des Th2-Inhibitors in Experiment B berechtigten Anlass zu vermuten, dass bei Spender B eine Therapie mit dem Th2-Inhibitor einen deutlich größeren Therapieeffekt hätte als eine Glukokortikoid-Therapie.

Stärken und Limitationen der Arbeit

Ein positiver Aspekt dieser Arbeit liegt in dem Nachweis, dass dieses Tiermodell robust genug ist, um Therapeutika zu testen. Die Robustheit zeigt sich in der Entwicklung der Symptome und in der Antwort der immunologischen Zellen auf den Reiz in beiden Versuchen. Die Analysen in Form der hIgG/hIgE Bestimmung in den Seren und in Form der durchflusszytometrischen Analyse des Profils der Immunzellen in Milz und Darm sind ein geeignetes Mittel, die Induktion der Entzündung und Wirkung eines Therapeutikums zu messen. Durch die Auswahl von zwei Patienten als Spender, die sich deutlich in Verlauf und Manifestation unterschieden, konnte zudem gezeigt werden, wie entscheidend der Spenderhintergrund in diesem Modell ist. Der Nachweis der Wirksamkeit eines Th2 Inhibitors ist eine weitere wesentliche Stärke dieser Arbeit, da zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass Th2 Inhibitoren auch für Kolits zu einem Therapeutikum entwickelt werden könnten.

Die größte Limitation dieser Arbeit ist die eingeschränkte Generalisierbarkeit der Ergebnisse. Dies liegt vor allem an der geringen Zahl der Experimente mit nur zwei verschiedenen Spendern sowie deren unterschiedliche Reaktionen auf den Reiz durch Ethanol und die Therapie. Die hier gezeigten Ergebnisse müssen durch weitere Experimente mit verschiedenen Spendern erhärtet werden. Eine zweite Limitation liegt in der mangelnden Aussagekraft von einzelnen Analysen,

die durch eine höhere Gruppengröße vermutlich verbessert werden könnte. Für zukünftige Versuche ist es daher sinnvoll, die Gruppengröße der einzelnen Versuchsgruppen zu erweitern. Die Aussagekraft könnte zudem erhöht werden, wenn die entzündliche Antwort selbst verstärkt werden könnte. Dies könnte durch eine Modifizierung des Versuchsaufbaues oder durch eine Erhöhung der Anzahl an übertragenen Immunzellen erreicht werden.

Ausblick

Die weitere Erprobung des von uns verwendeten Th2-Inhibitors in diesem Tiermodell wird ein wichtiger Aspekt zukünftiger Forschung sein. Desweiteren muss die Hypothese, dass dieses Modell die menschliche Krankheit reflektiert, durch den Vergleich des Profils der eingewanderten Immunzellen in den Darm des Menschen und der Maus erhärtet werden. Nicht zuletzt sollte untersucht werden, wie der Reiz durch Ethanol die Symptome einer Kolitis auslösen kann. Dies würde vermutlich helfen, die Auslöser eines Schubs im Menschen besser zu verstehen.

Zusammenfassung

Colitis ulcerosa gehört zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und ist durch die T-Helferzell Typ 2 (Th2) Zytokine Interleukin IL-4 und IL-13 charakterisiert. Inhibitoren gegen diesen Signalweg versprechen möglicherweise einen spezifischen Eingriff in den entzündlichen Prozess, ohne das gesamte Immunsystem zu beeinflussen. Gängige Tiermodelle für die Th2 charakterisierte Colitis ulcerosa beruhen auf starken chemischen Reizen, in immunkompetenten Mäusen, durch die Colitis ulcerosa-ähnliche Symptome ausgelöst werden. Diese Mausmodelle spiegeln jedoch die hinsichtlich individueller Parameter sehr heterogene Patientenpopulation nicht wider. In dieser Gruppe wurde ein Tiermodell entwickelt, das auf immuninkompetenten NOD-scid IL2R γ -chain^{null} Mäusen beruht, die mit peripheren mononukleären Blutzellen, von an Colitis ulcerosa erkrankten Patienten, rekonstituiert wurden. In diesem Modell werden Colitis ulcerosa-ähnliche Symptome durch die rektale Applikation von Ethanol ausgelöst. Der schwache Reiz durch Ethanol induziert die vermehrte Sekretion von hIgG und hIgE, den Einstrom von inflammatorischen Zellen in die Lamina propria und Ödembildung.

In dieser Arbeit wurden die Wirkung des Glucocorticoids Prednisolon, die Wirkung eines spezifisch auf die IL-4/IL-13 Signalkaskade wirkenden TH2-Inhibitors und der Einfluss des Spenderhintergrunds auf die Entwicklung der Kolitis ähnlichen Symptome in diesem Modell untersucht.

Dazu wurden zur Rekonstitution der Mäuse zwei Spender ausgewählt, die sich stark in der Ausprägung der Krankheit, Ansprache auf die Behandlung und in ihrem immunologischen Profil unterschieden. Nach Rekonstitution wurde in den Mäusen, durch die rektale Applikation von Ethanol, Colitis ulcerosa-ähnliche Symptome ausgelöst und die Sekretion von hIgE und hIgG, das immunologische Profil der humanen Immunzellen der Milz und des Darms und die makroskopischen und histologischen Veränderungen des Darms im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Prednisolon-behandelten Gruppe analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass der jeweilige immunologische Hintergrund der Spender in den Mäusen weitgehend erhalten blieb und die Antwort auf den Reiz mit Ethanol beeinflusste. Dies zeigte sich vor allem in der Frequenz der T- und B-Zellen sowie der Sekretion von hIgG und hIgE. Der Spenderhintergrund beeinflusste sowohl die Wirkung von Prednisolon auf die Sekretion von hIgG und hIgE, als auch die Frequenz der B- und T- Zellen. Die Mäuse spiegelten den immunologischen Hintergrund der jeweiligen Spender wider. Der getestete Th2 Inhibitor zeigte die erwartete Wirkung und reduzierte die Frequenz der B-Zellen, der Th2 Zellen und die hIgG

und hIgE Sekretion. Makroskopisch und histologisch wies das Kolon innerhalb dieser Gruppe keine Veränderungen auf.

Diese Arbeit zeigt die wichtige Rolle des Spenderhintergrundes auf Ausprägung, Verlauf und Ansprache auf Therapeutika. Zudem zeigte sie durch die Wirkung des spezifischen Th2-Inhibitors, dass dieses Tiermodell geeignet ist human-spezifische Inhibitoren zu testen.

Summary

Validation of a humanized animal model for ulcerative colitis

Ulcerative colitis belongs to the T helper cell type 2 (Th2) induced inflammatory diseases and is characterized by the cytokines interleukin IL-4 and IL-13. Inhibitors addressing these pathways might allow for more specific interventions without affecting the general immune system. The conventional Th2 characterized animal models for Colitis ulcerosa rely on immune-competent mice challenged with toxic chemicals inducing similar symptoms to the human disease. However, these models do not reflect individual parameters of the heterogeneous patient population. This group developed a novel animal model which is based on immune-incompetent NOD-scid IL2R γ -chain^{null} mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells isolated from patients suffering from ulcerative colitis. In this model colitis resembling symptoms were induced by rectal application of ethanol. These mice developed symptoms and phenotypes characterized by enhanced hIgG and hIgE secretion, diarrhea, weight loss, influx of inflammatory cells into the lamina propria and the development of edema.

This thesis examines the response to the glucocorticoid prednisolone, the response to a specific on the IL-4/IL-13 signalling pathway targeting Th2-Inhibitor and the influence of the donors background on the development of clinical symptoms in this model.

For the experiments two donors were selected differing significantly with respect to their immunological profile, manifestation of disease and response to treatment. Following reconstitution mice were challenged with ethanol and subjected to analysis to include levels of IgG and IgE, the immunological profiling of human immune cells isolated from spleen and colon, macroscopic and histological changes of the colon. Data were compared to the control- and prednisolone-treated group. These data indicated that the immunological background of the donor is conserved and affects the response to the challenge with ethanol as shown by the frequency of B- and T-cells and the hIgG levels. In addition, the immunological background affected the response to prednisolone with respect to hIgG and hIgE secretion, and frequency of T- and B-cells. The response of the mice reflected the response of the respective donor. As expected, the Th2 inhibitor reduced the frequency of B- and T- and Th2 cells which ultimately resulted in the reduction of hIgG and hIgE to baseline levels. Macroscopically and histologically the colon within this particular group did not exhibit pathological alterations.

This work shows the importance of the donors background on varying degree of severity, clinical course and response to therapy. Further the response to the specific Th2-inhibitor showed the suitability of this model testing human specific inhibitors.

Literatur

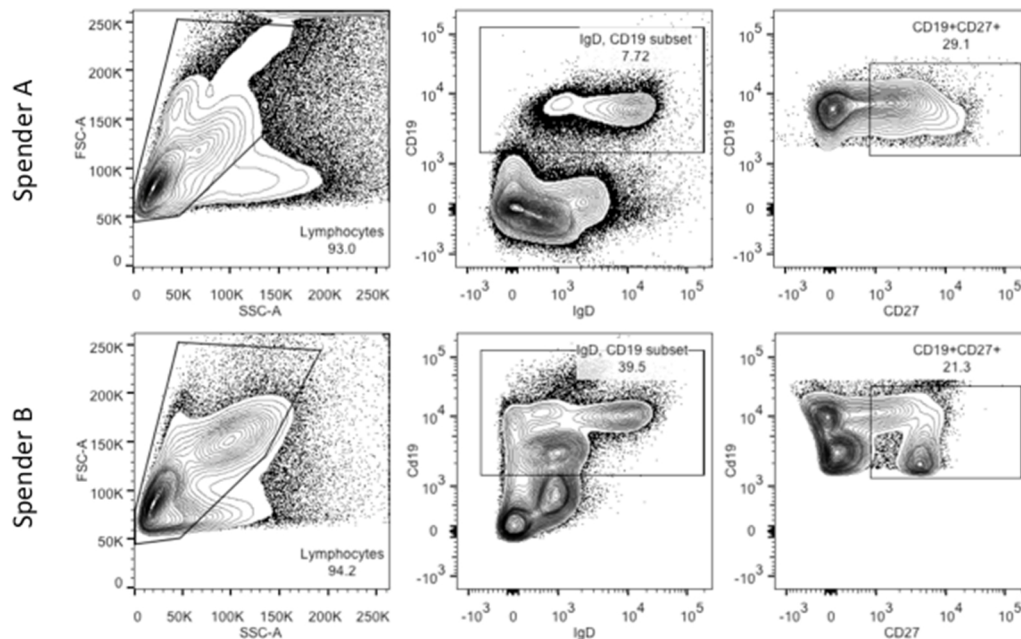
1. Herold, G., *Innere Medizin*. Vol. 1. 2014, Köln: Herold, Gerd., S. 475-482
2. Dignass, A., et al., [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Z Gastroenterol*, 2011. **49**(9): p. 1276-341.
3. Gasparetto, M. and G. Guariso, *Highlights in IBD Epidemiology and Its Natural History in the Paediatric Age*. *Gastroenterol Res Pract*, 2013. **2013**: p. 829040.
4. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
5. Binder, V., *Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2004. **18**(3): p. 463-79.
6. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(6): p. 417-29.
7. Taylor, K.M. and P.M. Irving, *Optimization of conventional therapy in patients with IBD*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **8**(11): p. 646-56.
8. Hausmann, O.V., et al., *The complex clinical picture of side effects to biologicals*. *Med Clin North Am*, 2010. **94**(4): p. 791-804, xi-ii.
9. Ochsenkuhn, T., M. Sackmann, and B. Goke, [Inflammatory bowel diseases (IBD) -- critical discussion of etiology, pathogenesis, diagnostics, and therapy]. *Radiologe*, 2003. **43**(1): p. 1-8.
10. D'Haens, G.R., et al., *The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn's and Colitis Organization: when to start, when to stop, which drug to choose, and how to predict response?* *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(2): p. 199-212; quiz 213.
11. Orlando, A., et al., *The Italian Society of Gastroenterology (SIGE) and the Italian Group for the study of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) Clinical Practice Guidelines: The use of tumor necrosis factor-alpha antagonist therapy in inflammatory bowel disease*. *Dig Liver Dis*, 2011. **43**(1): p. 1-20.
12. Blumenstein, I., et al., *Female patients suffering from inflammatory bowel diseases are treated less frequently with immunosuppressive medication and have a higher disease activity: a subgroup analysis of a large multi-centre, prospective, internet-based study*. *J Crohns Colitis*, 2011. **5**(3): p. 203-10.
13. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
14. Geremia, A., et al., *Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease*. *Autoimmun Rev*, 2014. **13**(1): p. 3-10.

15. Hisamatsu, T., et al., *Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Pharmacol Ther, 2013. **137**(3): p. 283-97.
16. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon, *The fundamental basis of inflammatory bowel disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 514-21.
17. Wehkamp, J., et al., *Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2003. **9**(4): p. 215-23.
18. Buonocore, S., et al., *Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1371-5.
19. Van Dyken, S.J. and R.M. Locksley, *Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 317-43.
20. Seidelin, J.B., et al., *IL-33 promotes GATA-3 polarization of gut-derived T cells in experimental and ulcerative colitis*. J Gastroenterol, 2015. **50**(2): p. 180-90.
21. Okamura, M., et al., *Overexpression of GATA-3 in T cells accelerates dextran sulfate sodium-induced colitis*. Exp Anim, 2014. **63**(2): p. 133-40.
22. Rosen, M.J., et al., *STAT6 deficiency ameliorates severity of oxazolone colitis by decreasing expression of claudin-2 and Th2-inducing cytokines*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1849-58.
23. Rosen, M.J., et al., *STAT6 activation in ulcerative colitis: a new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(11): p. 2224-34.
24. Kawashima, R., et al., *IL-13 receptor alpha2 promotes epithelial cell regeneration from radiation-induced small intestinal injury in mice*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 130-41.
25. Kawashima, R., et al., *Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in mice-a pathway associated with ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2011. **141**(6): p. 2119-2129 e8.
26. Fuss, I.J., et al., *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1490-7.
27. Andre, C., et al., *Transgenic mice carrying the human beta 2-adrenergic receptor gene with its own promoter overexpress beta 2-adrenergic receptors in liver*. Eur J Biochem, 1996. **241**(2): p. 417-24.
28. Suter, P., et al., *Lifespan studies on male and female mice and rats under SPF-laboratory conditions*. Arch Toxicol Suppl, 1979(2): p. 403-7.

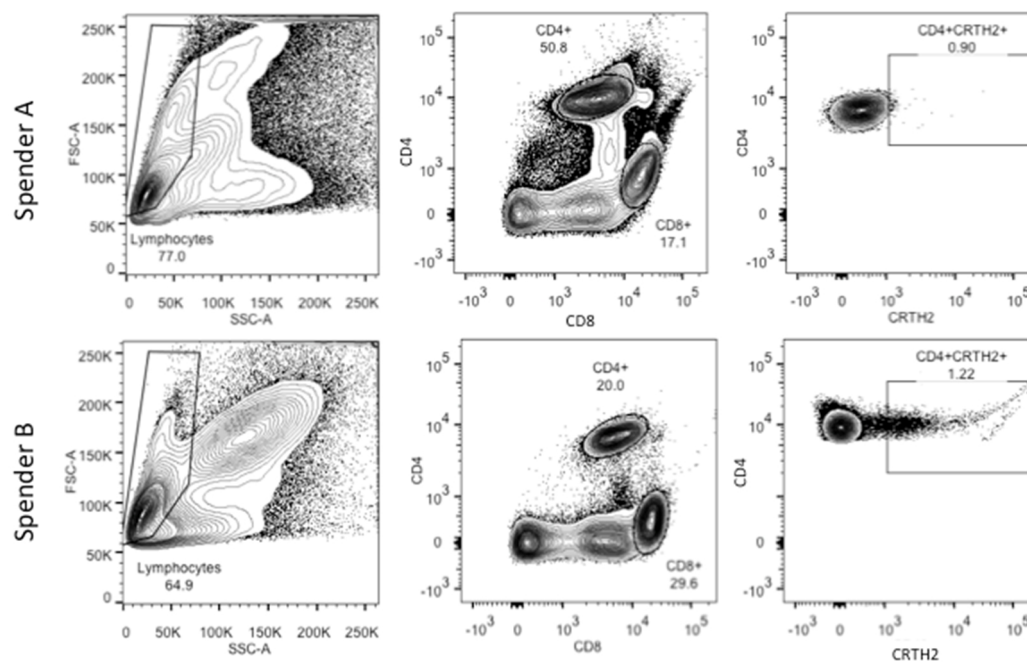
29. Heller, F., et al., *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 629-38.
30. Nolte, T., et al., *Oxazolone and ethanol induce colitis in non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2Rgamma(null) mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells*. Clin Exp Immunol, 2013. **172**(2): p. 349-62.
31. Nolte, T., et al., *Induction of oxazolone-mediated features of atopic dermatitis in NOD-scid IL2Rgamma(null) mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells*. Dis Model Mech, 2013. **6**(1): p. 125-34.
32. Zadeh-Khorasani, M., et al., *NOD-scid IL2R gamma null mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells as a model to test therapeutics targeting human signaling pathways*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 4.
33. Baker, M.B., et al., *The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2645-56.
34. Gorczynski, R.M., C.Y. Lau, and M. Robillard, *Graft-versus-host disease in murine bone marrow transplantation. II. Modulation of acute and chronic GVHD in mice receiving bone marrow allografts pretreated with immunosuppressive factor derived from a human T cell line*. Immunol Lett, 1985. **11**(5-6): p. 293-9.
35. Boirivant, M., et al., *Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1929-39.
36. Schnabel, F., *Charakterisierung des Modells der Dextransulfat induzierten Colitis der BALB/c-Maus*, in Medizinische Fakultät. 2010, Dissertation, LMU München: München.
37. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 550-64.
38. Donaldson, D.D., et al., *The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2317-24.
39. Urban, J.F., Jr., et al., *IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite Nippostrongylus brasiliensis*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 255-64.
40. Shultz, L.D., et al., *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6477-89.

-
41. Takayama, G., et al., *Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 98-104.
 42. R Core Team (2015). R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
URL <http://www.R-project.org/>.
 43. Shlomchik, W.D., *Graft-versus-host disease*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 340-52.
 44. Pinchuk, L.M. and N.M. Filipov, *Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice*. Immun Ageing, 2008. **5**: p. 1.
 45. Cho, B.K., et al., *Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells*. J Exp Med, 2000. **192**(4): p. 549-56.
 46. Le Campion, A., et al., *Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4538-43.
 47. Ge, Q., et al., *Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2989-94.
 48. Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik, *Life and death in peripheral T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 532-42.
 49. Karatsoreos, I.N., et al., *Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse*. Endocrinology, 2010. **151**(5): p. 2117-27.
 50. Coutinho, A.E. and K.E. Chapman, *The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **335**(1): p. 2-13.
 51. Mueller, T.D., et al., *Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 237-50.
 52. Park, C.S., et al., *Interleukin-4 and low-affinity receptor for IgE on B cells in peripheral blood of patients with atopic bronchial asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(5): p. 1121-8.
 53. Jowett, S.L., et al., *Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study*. Gut, 2004. **53**(10): p. 1479-84.

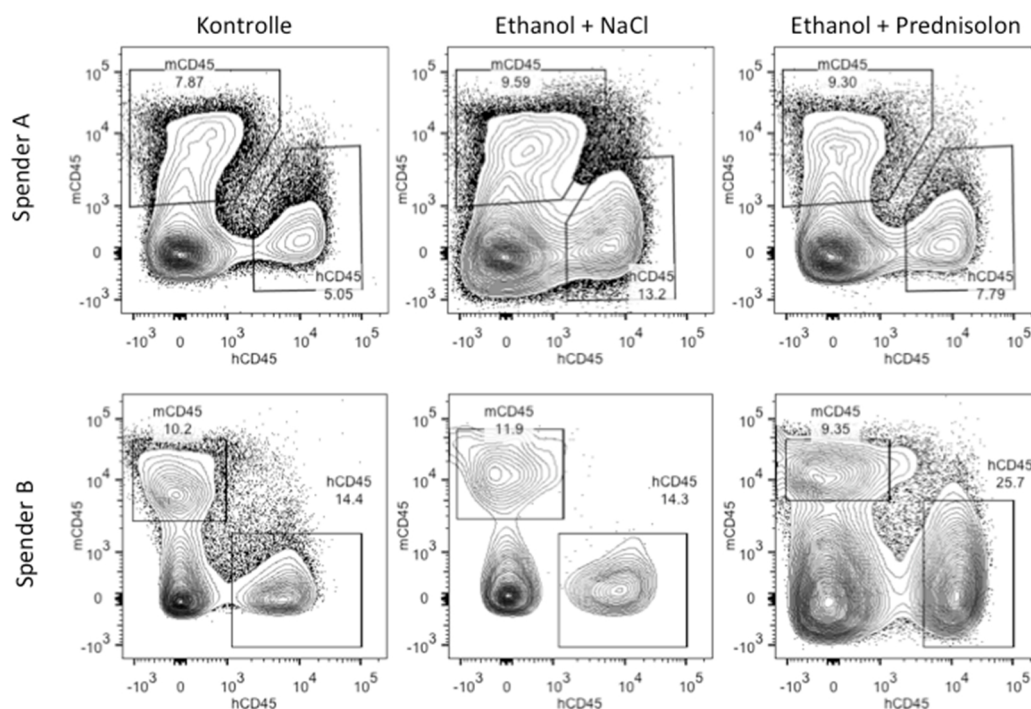
Anhang



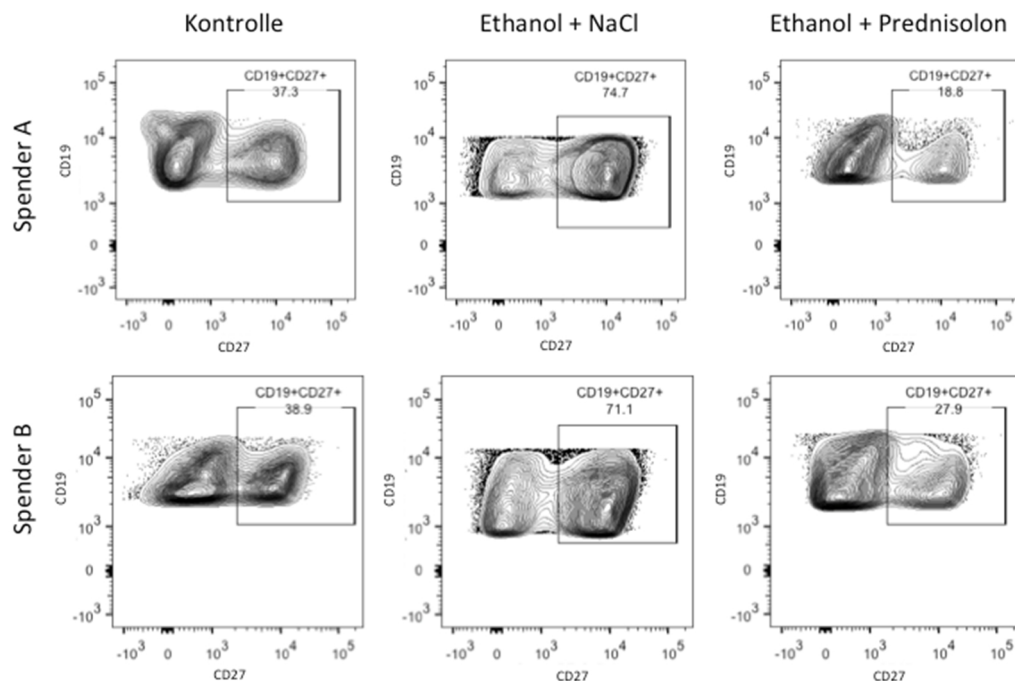
Anhang 1: Gating-Strategie zur Analyse der Frequenz und Maturationsstadium der B-Zellen in Gesamtlymphozyten. Humane B-Zellen tragen die Marker IgD⁺CD19⁺, humane aktivierte B-Zellen sind CD19⁺CD27⁺. Die folgende Analyse ist exemplarisch auch auf die restlichen Abbildungen in Anhang 1-12 anzuwenden. Bei den Markern handelt es sich jeweils um humane Marker, es sei denn etwas anderes ist explizit erwähnt. Aus dem ersten Abbildungsfenster oben links wird mittels Forward scatter (FSC-A) und side scatter (SSC-A) die Gesamtlymphozytenpopulation dargestellt und mittels Gate definiert. Aus der Population die sich in diesem Gate befindet wird in einem neuen Abbildungsfenster die CD19⁺-Population definiert die den CD19 Marker trägt. Innerhalb dieser Population wird in einem weiteren Abbildungsfenster die CD19⁺CD27⁺ bestimmt die beide Marker trägt und somit die aktivierten B-Zellen darstellt.



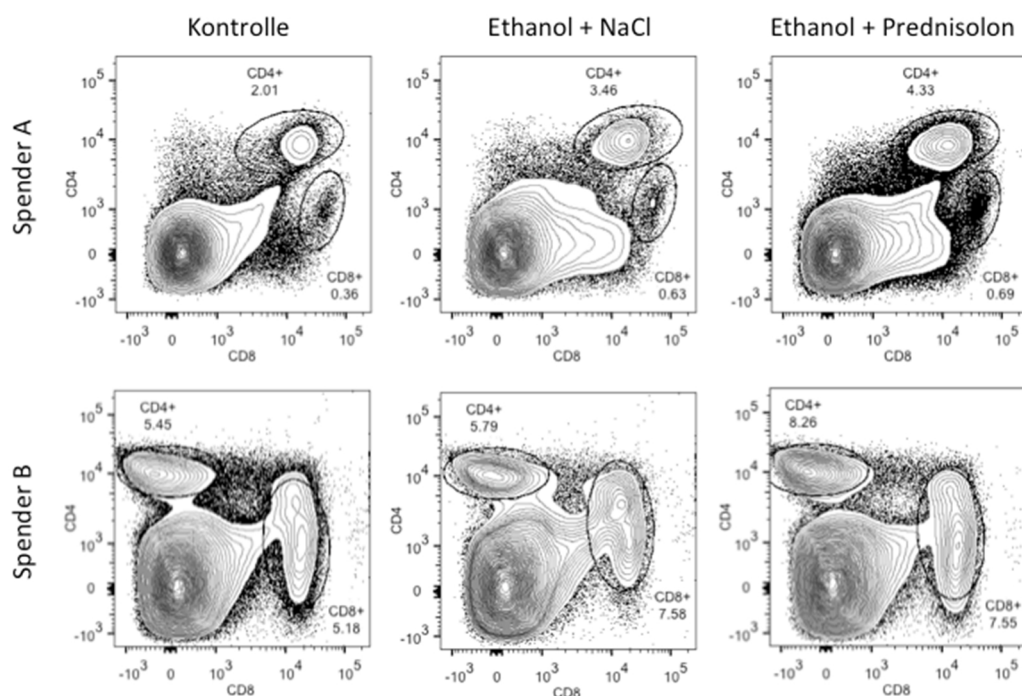
Anhang 2: Gating-Strategie zur Analyse der Frequenz der T-Zellen in der Gesamtlmphozytenpopulation. $CD4^+$ Zellen tragen die Marker $CD4^+CD8^-$, $CD8^+$ Zellen sind $CD4^-CD8^+$ und Th2 Zellen sind $CD4^+CRTH2^+$.



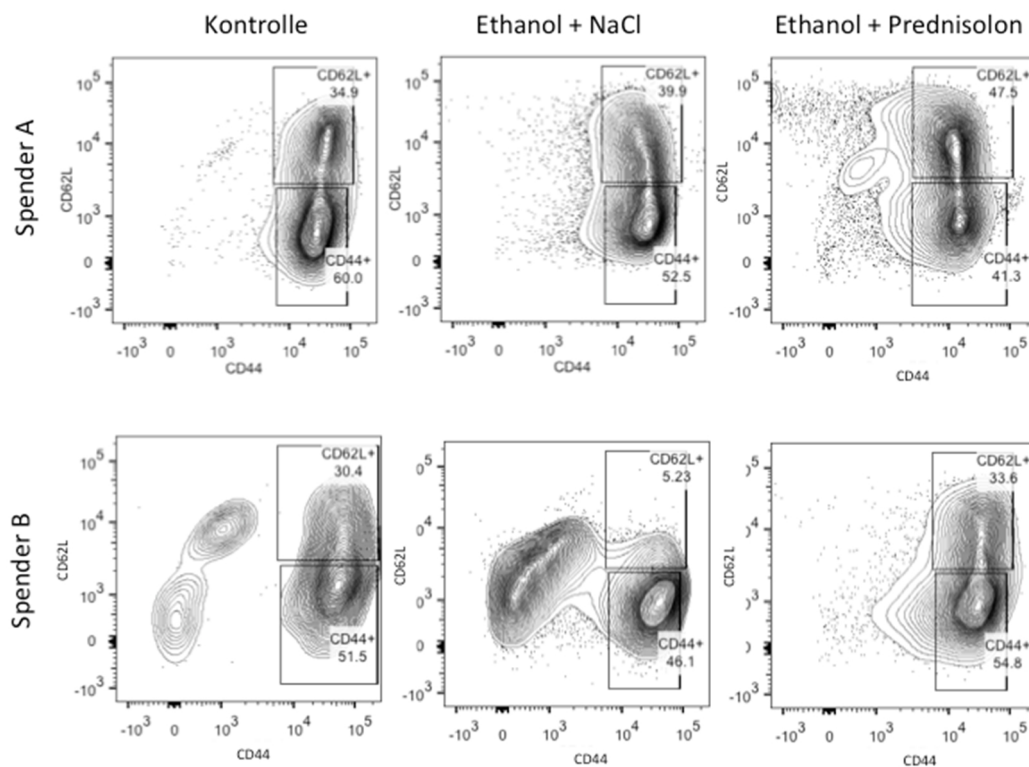
Anhang 3: Gating-Strategie zur Analyse der maus- und humanen CD45 Zellen (mCD45 und hCD45) in der Gesamtlmphozyten Population in Abhängigkeit von Spender und Behandlung.



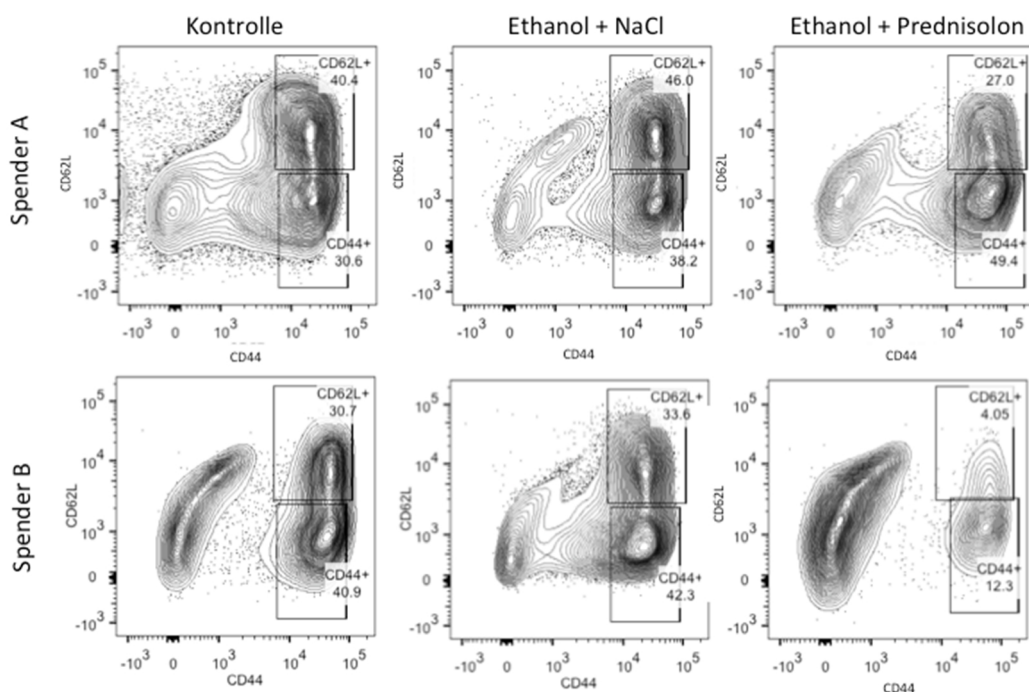
Anhang 4: Gating-Strategie der Frequenz und Maturation humaner B-Zellen in Abhängigkeit von Spender und Behandlung. CD19⁺CD27⁺ Zellen sind aktivierte B Zellen.



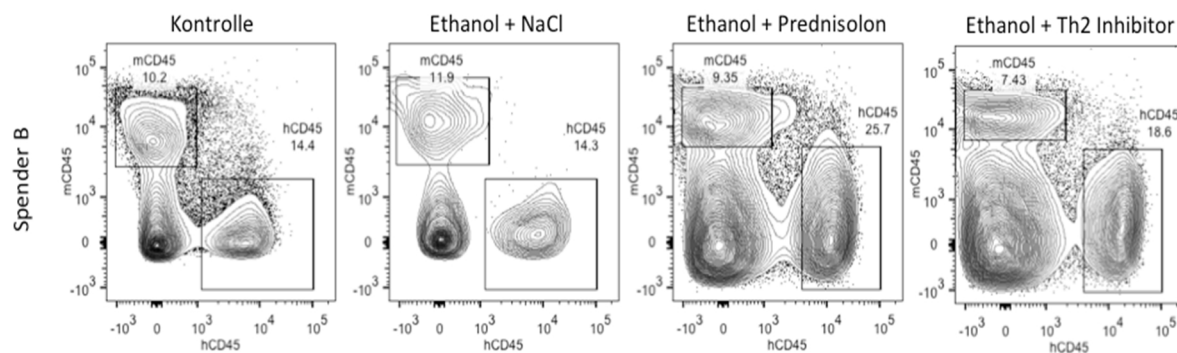
Anhang 5: Gating-Strategie humaner T-Zellen (hCD4⁺ und hCD8⁺) in Abhängigkeit von Spender (A und B) sowie Behandlung. CD4⁺ Zellen sind CD4⁺ CD8⁻ während CD8⁺ Zellen CD4⁻ CD8⁺ sind.



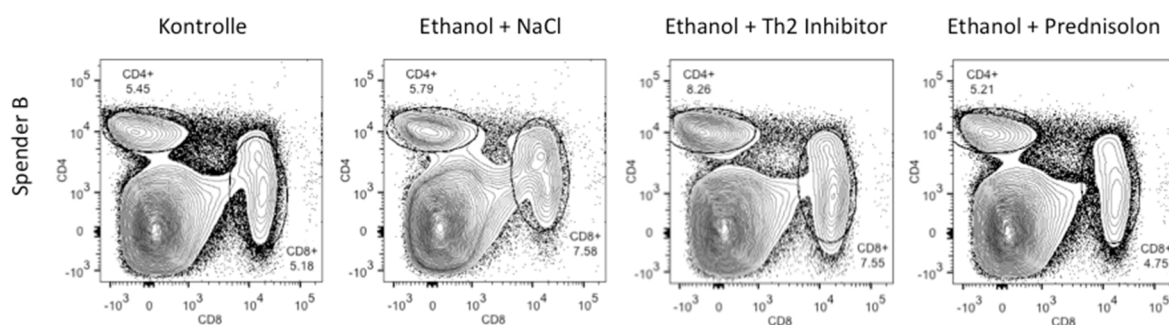
Anhang 6: Gating-Strategie zur Analyse der naiven (CD62L⁺) und aktivierten (CD44⁺) CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von Spender und Behandlung.



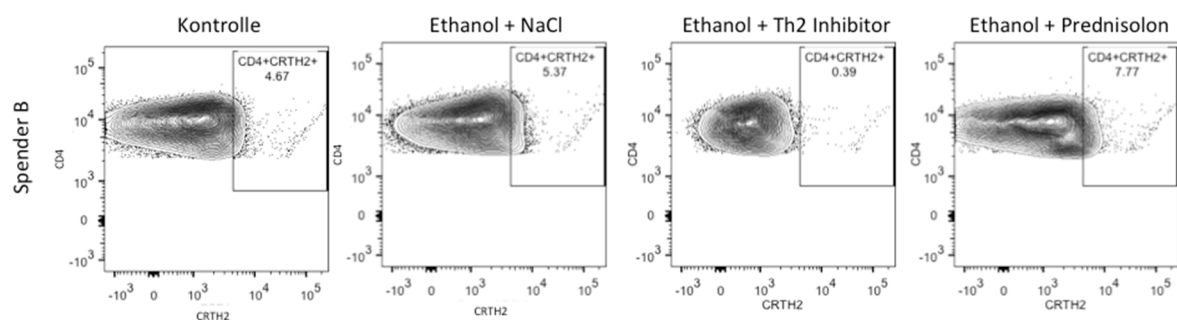
Anhang 7: Gating-Strategie zur Analyse der naiven (CD62L⁺CD44⁻) und aktivierten (CD62L⁻CD44⁺) CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von Spender und Behandlung.



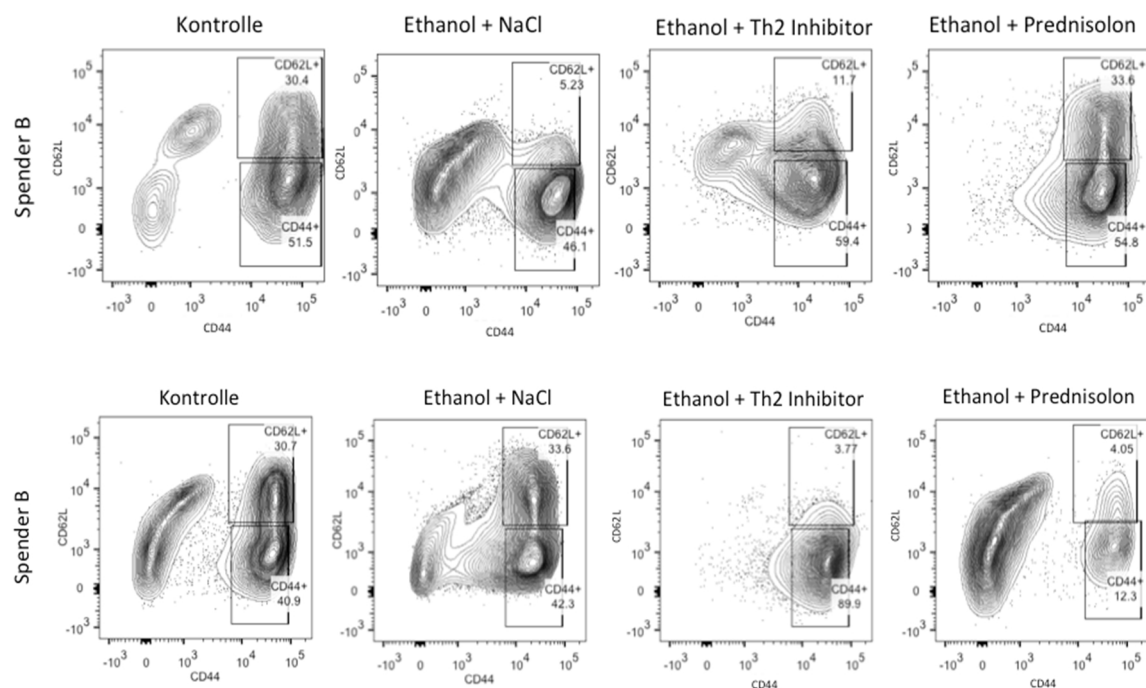
Anhang 8: Gating-Strategie zur Analyse der maus- und humanen CD45 Zellen (mCD45 und hCD45) in der Gesamtlymphozyten Population in Abhängigkeit von Spender und Behandlung.



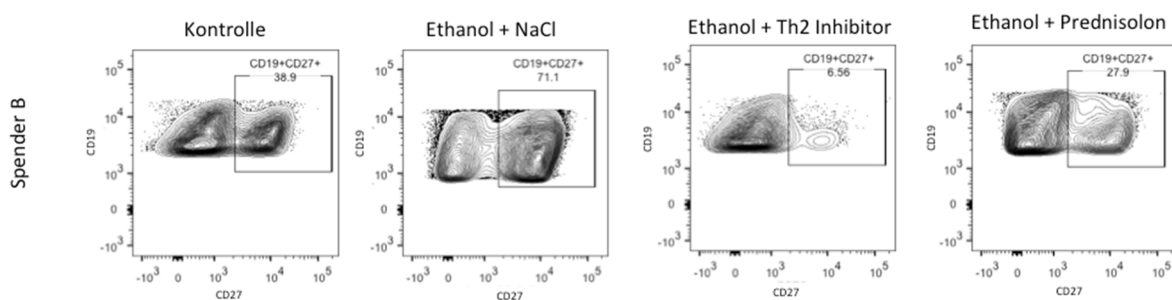
Anhang 9: Gating-Strategie humaner T-Zellen (hCD4+ und hCD8+) in Abhängigkeit von der Behandlung. Bei der oberen Population handelt es sich um die hCD4⁺ Zellen während des sich bei der rechten Population jeweils um hCD8⁺ Zellen handelt.



Anhang 10: Gating Strategie - Th2 (CRTH2⁺) Zellen an der gesamten CD4⁺ Population in Abhängigkeit von der Behandlung.



Anhang 11: Gating-Strategie zur Analyse der aktivierten (CD62L⁺CD44⁺) zu naiven (CD62L⁺CD44⁻) CD4⁺ (oben) und CD8⁺ (unten) Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.



Anhang 12: Gating Strategie zur Analyse der Frequenz aktivierter B-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Theorie der wichtigsten immunologischen Vorgänge in der Entwicklung der Colitis ulcerosa.	18
Abb. 2: Analyseschema der Proben des Tierversuches	37
Abb. 3: Boxplot Graphik - Anteil humaner CD45 Zellen in der Gesamtymphozyten Population der Maus in Abhängigkeit von Spender (A und B), sowie Behandlung.....	44
Abb. 4: Boxplot Graphik - Klinischer Aktivitätsscore in Abhängigkeit von Behandlung und Spender (A und B).....	45
Abb. 5: Boxplot Graphik - Sekretion von hIgG (links) und hIgE (rechts) in Abhängigkeit von Behandlung und Spender (A und B).	46
Abb. 6: Boxplot Graphik - Frequenz humaner B-Zellen (hCD19 ⁺ , links) und aktivierter B-Zellen (hCD19 ⁺ hCD27 ⁺ , rechts) in Abhängigkeit von Spender (A und B), sowie Behandlung.	47
Abb. 7: Boxplot Graphik - Frequenz humaner T-Zellen (hCD4 ⁺ , links / hCD8 ⁺ , rechts) in Abhängigkeit von Spender (A und B), sowie Behandlung.	49
Abb. 8: Boxplot Graphik - Verhältnis von aktivierten zu naiven hCD4 ⁺ und hCD8 ⁺ Zellen in Abhängigkeit von Spender und Behandlung.	51
Abb. 9: Boxplot Graphik - Kolonlänge in Abhängigkeit von Spender (A und B), sowie Behandlung.	51
Abb. 10: Exemplarische Bilder des histologischen Querschnittes des Kolons in Abhängigkeit von der Behandlung.....	53
Abb. 11: Effekt der Therapie auf das Einwandern der Immunzellen in das Kolongewebe.	54
Abb. 12: Boxplot Graphik - Anteil humaner CD45 Zellen in der Gesamtymphozyten Population der Maus in Abhängigkeit von der Behandlung.	56
Abb. 13: Boxplot Graphik - Klinischer Aktivitätsscore in Abhängigkeit von der Behandlung.	57
Abb. 14: Boxplot Graphik - Frequenz humaner T-Zellen (hCD4 ⁺ und hCD8 ⁺) in Abhängigkeit von der Behandlung.....	58
Abb. 15: Boxplot Graphik – Frequenz der Th2 Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.	59
Abb. 16: Boxplot Graphik - Verhältnis von aktivierten zu naiven hCD4 ⁺ und hCD8 ⁺ Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.....	60
Abb. 17: Boxplot Graphik – Frequenz der B-Zellen (hCD19 ⁺ , links) und aktivierten B-Zellen (hCD19 ⁺ hCD27 ⁺ , rechts) in Abhängigkeit von der Behandlung.	61
Abb. 18: Boxplot Graphik – Serumkonzentration der hIgG und hIgE Antikörper in Abhängigkeit von der Behandlung.....	62
Abb. 19: Boxplot Graphik - Kolonlänge in Abhängigkeit von der Behandlung.....	63
Abb. 20: Effekt der Behandlung auf das Einwandern der Immunzellen in das Kolon. B.....	63

Abb. 21: Repräsentative histologischer Querschnitt des Kolons in Abhängigkeit von der Behandlung.	64
Anhang 1: Gating-Strategie zur Analyse der Frequenz und Maturationsstadium der B-Zellen in Gesamtlymphozyten	81
Anhang 2: Gating-Strategie zur Analyse der Frequenz der T-Zellen in der Gesamtlymphozytenpopulation	82
Anhang 3: Gating-Strategie zur Analyse der maus- und humanen CD45 Zellen (mCD45 und hCD45) in der Gesamtlymphozyten Population in Abhängigkeit von Spender und Behandlung	82
Anhang 4: Gating-Strategie der Frequenz und Maturation humaner B-Zellen in Abhängigkeit von Spender und Behandlung	83
Anhang 5: Gating-Strategie humaner T-Zellen (hCD4 ⁺ und hCD8 ⁺) in Abhängigkeit von Spender (A und B) sowie Behandlung	83
Anhang 6: Gating-Strategie zur Analyse der naiven (CD62L ⁺) und aktivierten (CD44 ⁺) CD4 ⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von Spender und Behandlung	84
Anhang 8: Gating-Strategie zur Analyse der maus- und humanen CD45 Zellen (mCD45 und hCD45) in der Gesamtlymphozyten Population in Abhängigkeit von Spender und Behandlung	85
Anhang 9: Gating-Strategie humaner T-Zellen (hCD4 ⁺ und hCD8 ⁺) in Abhängigkeit von der Behandlung	85
Anhang 10: Gating Strategie - Th2 (CRTH2 ⁺) Zellen an der gesamten CD4 ⁺ Population in Abhängigkeit von der Behandlung	85
Anhang 11: Gating-Strategie zur Analyse der aktivierten (CD62L ⁻ CD44 ⁺) zu naiven (CD62L ⁺ CD44 ⁻) CD4 ⁺ (oben) und CD8 ⁺ (unten) Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung	86
Anhang 12: Gating Strategie zur Analyse der Frequenz aktivierter B-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Charakteristika bei Colitis ulcerosa modifiziert nach Podolsky et al.	14
Tabelle 2: Medikamentelle Therapieoptionen bei Colitis ulcerosa (modifiziert nach Podolsky et al.)	17
Tabelle 3: Tierversuchs-Gruppengröße nach Spender und Behandlung.....	33
Tabelle 5: Kriterien zur Feststellung des klinischen Aktivitätsscore.	36
Tabelle 6: Zusammenfassung der gemessenen zellulären Marker mit ihrer Funktion. T=	39
Tabelle 7: Klinische Daten der Spender.....	42
Tabelle 8. Durchflusszytometrische Zusammenfassung des immunologischen Spenderhintergrundes.	43

Danksagung

Ich möchte an erster Stelle Herrn Professor Dr. Siebeck danken, dessen großes Engagement bei der Korrektur dieser Arbeit mir eine große Stütze war.

Auch möchte ich Frau Dr. Roswitha Gropp und Herrn Professor Dr. Wolf für die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen danken.

Liebe Ksenija, dir gilt mein besonderer Dank, dein fachlicher Rat und deine beruhigenden Worte haben mir unwahrscheinlich viel bedeutet.

Auch meinem restlichen Team Frau Janet Muriyadan und Herrn Michael Föhlinger möchte ich ganz herzlich danken, ihr wart eine wahre Bereicherung.

Frau Dr. Annalena Riedasch und dem ganzen ZVH-Team möchte ich für die schöne Zeit in Ihren Reihen danken.

Meiner Familie möchte ich für die nie endende Unterstützung danken.

Besonders möchte ich auch meiner Freundin Frau Stephanie Schneider für die mir entgegengebrachte Liebe danken, die mir auch in stressigen Zeiten Rückhalt und Geborgenheit gegeben hat.